

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología  
Universidad Autónoma de Barcelona

Programa de Doctorado en Inmunología

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS  
B INFILTRANTES EN ISLOTES PANCREÁTICOS EN RATONES NOD.  
IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO NEUROENDOCRINO RECONOCIDO  
PREDOMINANTEMENTE POR ESTA POBLACIÓN CELULAR.**

M<sup>a</sup>Carmen Puertas Castro

Tesis Doctoral

Mayo 2006





Badalona, Mayo de 2006

La tesis doctoral “Caracterización fenotípica y funcional de los linfocitos B infiltrantes en islotes pancreáticos en ratones NOD. Identificación del antígeno neuroendocrino reconocido predominantemente por esta población celular”, ha sido realizada por M<sup>a</sup>Carmen Puertas Castro, bajo la dirección del Dr. Joan Verdaguer Autonell, en el Laboratorio de Inmunobiología para la Investigación y Aplicaciones Diagnósticas (LIRAD-BST), del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol.

La doctoranda

El director de tesis

M<sup>a</sup>Carmen Puertas Castro

Dr. Joan Verdaguer Autonell  
Profesor Titular de Inmunología  
Universitat de Lleida



*Ella está en el horizonte...  
Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos.  
Camino diez pasos  
y el horizonte se corre diez pasos más allá.  
Por mucho que yo camine nunca la alcanzaré.  
¿Para qué sirve la utopía?  
Para eso sirve: para caminar.*

*Eduardo Galeano*

**A mis padres.**



Llegados a este punto, no puedo dejar escapar la oportunidad de rendir un pequeño homenaje a todos los que habéis contribuido a la realización de este trabajo. A todos vosotros debo agradecer que haya completado mi etapa predoctoral y, sobretodo, el haberla disfrutado.

Al Dr. Joan Verdaguer, mi jefe, por haberme dado la oportunidad de llegar hasta aquí y por haber confiado en mí desde el principio (aunque me dieran yuyu los ratones).

A mis compis del Lab3, porque me habéis enseñado lo que verdaderamente significa trabajar en equipo, realmente ha sido un placer trabajar (y reír, cotillear, ...) con vosotros. A Jorge, mi más mejor compi-apañao, por ser el "mirlo blanco" del laboratorio, por aguantar estoicamente todas mis neuras y mis dudas existenciales dentro y fuera del laboratorio, porque sin tu apoyo no habría llegado hasta aquí. A Aurora, la co-fundadora del Lab3, por saber transformar la rutina de cada día en un evento social, por las crisis compartidas, por los desfases a altas horas de la madrugada en épocas de tesina, los momentos marujiles en los congresos, los incendios, la organización de karaokes y entregas de premios.... A Rosa, por tener una paciencia de oro con todos nosotros, y porque " los experimentos más importantes se hacen allá abajo", pero no se hacen solos, los haces tú. A Xavier, por aportar el toque de "cordura" cuando el trabajo se convierte en obsesión, por tu risa contagiosa, y por el "milagro de la re-educación". A Raquel, por ser Miss-brujita-buena-de-los-westerns, porque eres un ejemplo de paciencia y empeño, y por mantener tu ilusión por la investigación. A la Maruchi, por ser "tremenda", por los momentos de diversión y los de desahogo.

A la Dra. Marta Vives, por su ayuda en momentos de crisis científicas y/o existenciales.

Al Dr. Ricardo Pujol-Borrell, por aceptar hacerme una entrevista cuando me presenté por primera vez en la Unidad (sin cita previa) y por presentarme y recomendarme a quien sería mi director de tesis.

A la Dra. Dolores Jaraquemada, por seguir siempre atenta y dispuesta a ayudar.

Al resto de "jefes" del laboratorio: Al Dr. Manel Joan y el Dr. Francesc Borràs, por las críticas constructivas y el apoyo logístico. A Eva Martínez, por ser tan atenta y cercana, y por su buena disposición para colaborar. A M<sup>a</sup>José, porque podría escribir un libro sobre "cómo ser responsable de las sesiones de la unidad y no morir linchada en el intento", por ser un ejemplo de diplomacia y buen humor.

Al resto de compañeros del laboratorio. A los que continúan: Rosa Faner, Roger y Pilar. Y a los que ya se fueron: Lidia, Patricia, Kolko, Cristina, Xavi. Porque cada uno ha aportado su granito de arena. A los que acaban de empezar: Marta y Xavi. Por el interés y la ilusión que transmitís

a los veteranos. A los estudiantes en practicas: Marta, Laura, Roger, Carlota. Porque, además de aprender, también han currao lo suyo.

A Roxana, por animarme a empezar esta aventura; gracias por acogerme y enseñarme cuando recién llegué al laboratorio y por mostrarme lo que significa el amor por la ciencia. A Alberto, por mantener siempre ese buen humor contagioso, y por escucharme y ayudarme a analizar los problemas objetivamente.

A las mujeres de rojo: Olga, Silvia, Pepi, Marga, Yoli. Por estar siempre dispuestas a echar una mano... y unas risas.

A los dos hombres más buscados del hospital: Marco y Jose M<sup>a</sup>. Por haber soportado estoicamente todas mis preguntas, dudas, comentarios, pruebas,...

A las chicas de Micro: Olga, Evelyn, Isabel, Virginia, Cris, Neus. Y también al equipo masculino: Pere Joan, Jorge, Sergi. Por haber demostrado al mundo (o al menos a una parte) que las "fronteras" sólo existen para los que quieren creer en ellas.

A Trini, por las horas extras de terapia psicológica que nunca me cobró.

A Marga, por su predisposición a ayudar en todo momento, y tener siempre recursos para todo. Y al resto de "habitantes" del estabulario: Josep, Ramón, Eli y Vio. Por su colaboración, y esas comilonas de "germanor".

A toda la gente del Cis, de IrsiCaixa, y de Anatomía Patológica, porque "es triste de pedir..." pero en más de una ocasión me han sacado de un apuro.

A la gente de Inmuno de la Autónoma: Aura, Manuela, Raúl, Mercè y Laia. Por compartir su experiencia. A Iñaki, por estar siempre disponible para ayudar, por las largas charlas en las épocas de prácticas, y los auxilios en momentos de emergencia "bioquímica". A Eva, la benjamina, por mantener la sonrisa, aunque los resultados no siempre acompañen. A Maica y Ernesto, por su ayuda con los papeleos.

Al Dr. Oriol Bachs, por ser tan accesible y guiarnos en "el desconocido mundo de las proteínas del citoesqueleto". A Josep M<sup>a</sup> Estanyol y Anna Morera, de la Plataforma de Proteómica de la Facultad de Medicina del Clínico, por su colaboración en el análisis de proteínas.

A las Biolocas, porque después de más de 10 años juntas, cada vez valoro más el teneros como amigas. Por ser tan poco objetivas y apoyarme siempre, por ser tan dulces en los momentos difíciles, por ser tan... marujiles!



A Fede, por ser infinitamente comprensivo. A Natalia, por mantenerte cerquita a pesar de los kilómetros de distancia. A Laura, Cristina, Susana y Javi, por seguir ahí, aunque yo ande siempre ocupadísima.

A mi familia. A Ponchin, Joan, Paquito, M<sup>a</sup>Carmen, mis tíos y mi prima, por ser tan comprensivos con mis horarios laborales “flexibles”, demasiado a menudo incompatibles con los compromisos familiares. Y especialmente a mis padres, porque habéis hecho posible que yo llegara hasta aquí.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!





## ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

<b>APC:</b> Célula presentadora de antígeno	<b>MALDI:</b> Ionización/desorpción por láser asistida por matriz
<b>ATCC:</b> <i>American Type Culture Collection</i>	<b>MCC:</b> Medio de cultivo completo
<b>BAFF:</b> <i>B-cell-activating factor</i>	<b>MFI:</b> Mediana de la intensidad de fluorescencia ( <i>median fluorescence intensity</i> )
<b>BB:</b> Bio-Breeding diabetes-prone rat	<b>MHC:</b> Complejo principal de histocompatibilidad ( <i>Major histocompatibility complex</i> )
<b>BCA:</b> <i>Bicinchoninic acid</i>	<b>MS:</b> Esclerosis múltiple
<b>BCR:</b> Receptor de antígenos de células B	<b>MZ:</b> zona marginal ( <i>marginal zone</i> )
<b>BSA:</b> albúmina sérica bovina	<b>NA/LE:</b> <i>no azide/low endotoxin</i>
<b>cDNA:</b> DNA complementario a la cadena de RNA mensajero	<b>NK:</b> Célula citocida natural (natural killer)
<b>CFSE:</b> <i>Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester</i>	<b>NOD:</b> <i>Non-obese diabetic mouse</i>
<b>CHAPS:</b> sulfonato de 3-[(3-cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano	<b>NOR:</b> <i>Non-obese resistant mouse</i>
<b>DMSO:</b> Dimetil sulfóxido	<b>PAGE:</b> <i>Poliacrilamide gel electrophoresis</i>
<b>DNA:</b> Ácido desoxiribonucleico	<b>PAMPs:</b> <i>pathogen associated molecular patterns</i>
<b>dNTPs:</b> Deoxinucleótido trifosfato	<b>PBS:</b> Tampón fosfato salino
<b>DTT:</b> Ditiotreitól	<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa
<b>EAE:</b> encefalitis autoinmune experimental	<b>PE:</b> <i>Phycoerythrin</i>
<b>FBS:</b> Suero fetal bovino	<b>PerCP:</b> <i>Peridinin chlorophyll protein</i>
<b>Fc:</b> Fracción constante de las inmunoglobulinas	<b>pI:</b> Punto isoeléctrico
<b>FITC:</b> <i>Fluorescein</i>	<b>PMA:</b> <i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
<b>GAD:</b> decarboxilasa del ácido glutámico	<b>PRRs:</b> <i>pattern recognition receptors</i>
<b>HBSS:</b> <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	<b>RNA:</b> Ácido ribonucleico
<b>HLA:</b> antígeno leucocitario humano	<b>rRNA:</b> RNA ribosómico
<b>HRP:</b> <i>Horseradish peroxidase</i>	<b>SDS:</b> Dodecil sulfato sódico
<b>HSP:</b> proteína de choque térmico	<b>SDS-PAGE:</b> electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
<b>IEF:</b> Isoelectroenfoque	<b>SPF:</b> Unidad libre de patógenos ( <i>specific-pathogen free</i> )
<b>ICA:</b> Anticuerpos contra islote	<b>T1D:</b> Diabetes tipo 1
<b>IFN:</b> Interferón	<b>TCR:</b> Receptor de antígeno de células T
<b>Ig:</b> Inmunoglobulina	<b>TFA:</b> Ácido trifluoroacético
<b>IGRP:</b> <i>islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein</i>	<b>TLR:</b> <i>toll-like receptor</i>
<b>IL:</b> Interleuquina	
<b>IPG:</b> <i>Immobilized pH gradient</i>	
<b>LPS:</b> Lipopolisacárido	





# ÍNDICE





<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Tolerancia versus autoinmunidad	1
1.1. El sistema inmunitario	1
1.2. Tolerancia	3
1.2.1. Mecanismos de tolerancia	4
1.2.2. Tolerancia de linfocitos T	5
1.2.2.1. Tolerancia central de linfocitos T	5
1.2.2.1.1. Selección positiva	5
1.2.2.1.2. Selección negativa	6
1.2.2.2. Tolerancia periférica de linfocitos T	6
1.2.2.2.1. Deleción clonal	6
1.2.2.2.2. Anergia	7
1.2.2.2.3. Ignorancia inmunológica	7
1.2.2.2.4. Supresión por linfocitos T reguladores	8
1.2.3. Tolerancia de linfocitos B	9
1.2.3.1. Tolerancia central de linfocitos B	9
1.2.3.1.1. Edición del receptor	9
1.2.3.1.2. Deleción clonal	9
1.2.3.1.3. Anergia	10
1.2.3.2. Tolerancia periférica de linfocitos B	10
1.2.3.2.1. Anergia	10
1.2.3.2.2. Exclusión folicular	10
1.2.3.2.3. Deleción clonal	11
1.2.3.2.4. Deleción en los centros germinales	11
1.3. Autoinmunidad	11
1.3.1. Mecanismos patogénicos en las enfermedades autoinmunitarias	13
1.3.1.1. Autoanticuerpos	14
1.3.1.1.1. Formación de inmunocomplejos	14
1.3.1.1.2. Eliminación de la célula diana	14
1.3.1.1.3. Actividad pro-inflamatoria	14
1.3.1.1.4. Activación/inhibición de receptores en la célula diana	15
1.3.1.2. Linfocitos T	15
1.3.1.2.1. Efecto citolítico directo	15
1.3.1.2.2. Inducción de la inflamación local	15
1.3.2. Factores genéticos de susceptibilidad al desarrollo de autoinmunidad	16
1.3.2.1. Enfermedades monogénicas	16
1.3.2.2. Enfermedades poligénicas	16
1.3.2.2.1. Alelos HLA	16
1.3.2.2.2. Otros genes de susceptibilidad	17
1.3.2.2.3. Factor hormonal	19

## Índice

1.3.3. Factores iniciadores de respuestas autorreactivas	19
1.3.3.1. Infecciones	19
1.3.3.1.1. Mimetismo molecular	20
1.3.3.1.2. Reversión del estado de anergia o de la ignorancia clonal	20
1.3.3.1.3. Activación policlonal	21
1.3.3.1.4. Liberación de autoantígenos	21
1.3.3.2. Alteraciones tisulares	21
1.3.3.3. Factores dietéticos	22
1.3.3.4. Fármacos	22
1.3.3.5. Factores estocásticos	22
2. Diabetes tipo 1	23
2.1. El páncreas	23
2.2. La diabetes tipo 1 en humanos	25
2.2.1. Epidemiología	25
2.2.2. Histopatología	26
2.2.3. Etiología	26
2.2.3.1. Factores genéticos	27
2.2.3.1.1. Genes de la región HLA	27
2.2.3.1.2. Otros loci de susceptibilidad	28
2.2.3.2. Factores ambientales	29
2.2.3.2.1. Infecciones víricas	30
2.2.3.3. Factores dietéticos	31
2.2.4. Autoanticuerpos	31
2.2.5. Prevención y tratamiento	34
2.3. Modelos animales en el estudio de la T1D	36
2.3.1. El ratón NOD	37
2.3.1.1. Factores genéticos de susceptibilidad/resistencia	37
2.3.1.2. Factores externos	39
2.3.1.3. Cepas emparentadas a NOD resistentes a la T1D	40
2.3.2. La rata BB	40
2.3.3. Otros modelos de T1D	41
2.4. Desarrollo de la T1D en el ratón NOD	42
2.4.1. Mecanismos efectores: linfocitos T	43
2.4.2. Mecanismos reguladores	45
2.4.3. Células presentadoras de antígenos	46
2.4.4. Autoantígenos	49

3. Los linfocitos B	53
3.1. Maduración y activación de los linfocitos B	53
3.1.1. Generación y maduración de los linfocitos B	53
3.1.2. Subpoblaciones de linfocitos B	54
3.1.2.1. Linfocitos B-1	55
3.1.2.2. Linfocitos B de zona marginal (MZ)	56
3.1.3. Activación de los linfocitos B	56
3.1.3.1. Estimulación antigénica ( <i>priming</i> )	57
3.1.3.2. Interacción antígeno-específica con linfocitos T CD4+	58
3.1.3.3. Diferenciación a células plasmáticas	59
3.1.3.4. Formación del centro germinal: maduración de la afinidad y producción de células memoria	60
3.2. Papel de los linfocitos B en la diabetes de tipo 1	61
3.2.1. Producción de autoanticuerpos	61
3.2.2. Presentación de antígenos y activación de la respuesta T	62
3.2.3. Actividad reguladora	63
3.3. Los linfocitos B infiltrantes en islotes: antecedentes del estudio	64
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>67</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>69</b>
1. Animales: condiciones de estabulación y mantenimiento	69
2. Análisis histológico	70
2.1. Obtención de criosecciones	70
2.2. Tinción histológica mediante inmunofluorescencia	70
3. Análisis de antígenos de superficie celular mediante citometría de flujo	72
3.1. Aislamiento de islotes pancreáticos mediante digestión con colagenasa	72
3.2. Disgregación y hemólisis del bazo	74
3.3. Disgregación de los ganglios linfáticos	74
3.4. Control de la digestión con colagenasa	75
3.5. Marcaje de antígenos de superficie	75
3.6. Análisis mediante citometría de flujo	76
3.7. Análisis estadístico	77
4. Detección de citoquinas intracelulares	78
4.1. Activación celular y bloqueo de la secreción	78
4.2. Marcaje de citoquinas intracelulares	79
4.3. Análisis mediante citometría de flujo	80
5. Estimulación "in vitro" de linfocitos B procedentes de infiltrado pancreático	80
5.1. Condiciones de cultivo	80
5.2. Análisis fenotípico de los linfocitos B activados	81

## Índice

6. Ensayos de proliferación de linfocitos T	81
6.1. Purificación de poblaciones linfocitarias T y B mediante sorting	81
6.2. Marcaje intracelular de linfocitos T con CFSE	82
6.3. Cultivos mixtos	83
6.4. Análisis de la proliferación mediante citometría de flujo	84
7. Inmunodetección de antígenos	84
7.1. Hibridomas	84
7.2. Líneas celulares	85
7.3. Tinción intracitoplasmática de células adherentes en cultivo	85
7.4. Western blot	87
7.4.1. Extracción de proteínas	87
7.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	89
7.4.3. Transferencia a membrana de nitrocelulosa	89
7.4.4. Detección inmunológica	91
8. Identificación molecular del antígeno	92
8.1. Electroforesis bidimensional	93
8.1.1. Preparación de las muestras	93
8.1.2. Primera dimensión: isoelectroenfoque	93
8.1.3. Segunda dimensión: SDS-PAGE	94
8.2. Identificación molecular	95
8.2.1. Tinción con plata de geles de poliacrilamida	95
8.2.2. Digestión con tripsina	96
8.2.3. Análisis de los fragmentos peptídicos mediante espectrometría de masas	96
9. Expresión ectópica de periferina	97
9.1. Células	97
9.2. Vectores	97
9.3. Transfección transitoria con lipofectamina	98
Anexo 1. Test para la detección de <i>Mycoplasma</i>	100
<b>IV. RESULTADOS / 1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS B INFILTRANTES EN ISLOTES PANCREÁTICOS</b>	<b>101</b>
1. Seguimiento de la evolución de la población de linfocitos B infiltrantes en islotes	101
1.1. Distribución de los linfocitos B	101
1.2. Proporción de linfocitos B	103
1.3. Análisis de la proliferación de linfocitos B “in situ”	106
1.4. Expresión del BCR y la molécula CD19 del complejo correceptor	107
2. Caracterización fenotípica de los linfocitos B infiltrantes en islotes	110
2.1. Caracterización fenotípica de los linfocitos B esplénicos	110
2.2. Caracterización fenotípica de los linfocitos B infiltrantes en islotes	112
2.2.1. Controles de la digestión con colagenasa	113

2.2.2. Características fenotípicas de los linfocitos B infiltrantes en el modelo NOD	114
2.2.3. Características fenotípicas de los linfocitos B infiltrantes en animales F1(NODxNOR)	118
3. Caracterización funcional de los linfocitos B infiltrantes en islotes	119
3.1. Caracterización de la respuesta de los linfocitos B infiltrantes a la activación "in vitro"	119
3.1.1. Control con medio de cultivo completo	120
3.1.2. Estimulación con LPS	121
3.1.3. Estimulación con anti-CD40 + IL-4	121
3.2. Análisis de la producción de citoquinas	123
3.3. Efecto de los linfocitos B infiltrantes sobre la proliferación de los linfocitos T	124
<b>IV. RESULTADOS / 2. CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DEL PATRÓN DE RECONOCIMIENTO NEUROENDOCRINO PREDOMINANTE</b>	<b>129</b>
1. Selección de líneas celulares productoras de antígeno	130
2. Caracterización del antígeno	131
2.1. Caracterización del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 228E1	132
2.2. Caracterización del conjunto de hibridomas con patrón neuronal	134
3. Identificación molecular del antígeno	135
4. Caracterización del reconocimiento diferencial de las diferentes isoformas de periferina	142
<b>V. DISCUSIÓN</b>	<b>147</b>
1. Características fenotípicas y funcionales de los linfocitos B infiltrantes en islotes pancreáticos	147
2. Identificación de la periferina como el autoantígeno neuroendocrino reconocido de forma predominante por la población de linfocitos B infiltrantes en islotes	160
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>167</b>
<b>VII. PUBLICACIONES RESULTANTES DE LA ETAPA PREDOCTORAL</b>	<b>169</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>171</b>





## I. INTRODUCCIÓN





## 1. TOLERANCIA versus AUTOINMUNIDAD

### 1.1. EL SISTEMA INMUNITARIO

La función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa del organismo frente a microorganismos infecciosos. Por lo tanto, el sistema inmunitario comprende todas aquellas células y moléculas responsables de la respuesta frente a agentes extraños y, por tanto, potencialmente dañinos para el organismo.

Para poder lograr una defensa efectiva contra los diferentes agentes infecciosos, el sistema inmunitario está estructurado en diferentes niveles. La **inmunidad innata** tiene como función principal distinguir aquellos agentes externos potencialmente patógenos de aquellos que no lo son, y supone la primera línea de defensa del organismo, ya que se activa rápidamente. Algunos componentes de la inmunidad innata funcionan de manera permanente, especialmente en las superficies epidérmicas y mucosas, cuya producción de mucinas, defensinas y lisozima evitan la entrada de microorganismos. La capacidad de la inmunidad innata para reconocer agentes patógenos que entran en el organismo se basa en una serie de receptores (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*) que reconocen patrones moleculares conservados en diferentes grupos de patógenos microbianos (PAMPs, del inglés *pathogen associated molecular patterns*). Estas estructuras como el lipopolisacárido (LPS), RNA bicatenario y polisacáridos ricos en manosa, entre otros, no se encuentran en las células de los mamíferos. La unión de estos receptores con sus ligandos induce la activación de diferentes mecanismos dirigidos a la eliminación de los patógenos. Algunos receptores solubles, como la proteína C reactiva, estimulan la vía del complemento, la cual puede inducir la lisis directa del microorganismo. Otros receptores de membrana, como los receptores depuradores (en inglés *scavenger receptors*) o el receptor de manosa, inducen la fagocitosis o endocitosis de los microorganismos por parte de macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Algunos PRRs como los TLRs (del inglés *toll-like receptors*) promueven la producción de proteínas que ayudan a la eliminación de los microorganismos (lisozima, fosfolipasa A, defensinas, proteínas del complemento, lactoferrina, NO sintasa, mieloperoxidasa) y la producción de citoquinas que inducen la reacción inflamatoria local, caracterizada por la atracción y activación de otros leucocitos.

Por otro lado, las células citocidas naturales (NK, del inglés *natural killers*), reconocen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) de clase I, que son expresadas de forma constitutiva en las células del propio organismo, pero que a menudo son reprimidas cuando las células son infectadas. De esta manera, las células NK son capaces de detectar y eliminar directamente células infectadas por microorganismos intracelulares.

## I. Introducción

La respuesta innata, representa la respuesta inicial contra numerosos microorganismos patógenos, y en muchos casos es suficiente para eliminar el patógeno. No obstante, la inmunidad innata está estrechamente relacionada con la inmunidad adaptativa. La **inmunidad adaptativa** (también denominada inmunidad adquirida o específica), es un mecanismo de repuesta más evolucionado, que es estimulado de forma específica tras la exposición a un determinado agente extraño. Aunque la activación completa de estos mecanismos requiere varios días, se adquiere mayor especificidad e intensidad de la respuesta alcanzada, así como capacidad de memoria. De esta manera, la respuesta de estos mecanismos ante exposiciones repetidas al mismo organismo, es mucho más efectiva que la respuesta innata. No obstante, la activación de la respuesta adaptativa depende de la activación previa de la respuesta innata, puesto que es esta última la que tiene la capacidad de distinguir aquellos agentes con potencial patógeno.

Los antígenos son aquellas moléculas que son reconocidas por los receptores de los linfocitos B y T, que son los principales componentes de la inmunidad adaptativa. Los linfocitos B pueden especializarse en la producción de inmunoglobulinas, también denominadas anticuerpos, que constituyen la **inmunidad humoral**. La zona del antígeno reconocida por los anticuerpos es el epítipo o determinante antigénico. Cuando los anticuerpos se unen específicamente al antígeno, pueden tener un efecto neutralizante directo. Además, la unión del anticuerpo a la superficie de los agentes infecciosos puede favorecer también, en función del isotipo de la inmunoglobulina en cuestión (IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, en humanos), la lisis mediada por complemento, mecanismos de fagocitosis y/o la liberación de mediadores inflamatorios [Harris et al., 1999].

Por su parte, los linfocitos T constituyen la **inmunidad celular**, especialmente orientada a la eliminación de aquellos microorganismos que residen y proliferan en el interior de las células del huésped, y por lo tanto no son accesibles a los anticuerpos circulantes. Los linfocitos T citotóxicos, mayoritariamente CD8+, tienen función citolítica sobre las células infectadas. Por su parte, los linfocitos T CD4+ colaboradores, están especializados en la producción de citoquinas que coordinan el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Según el patrón de citoquinas producido por estos linfocitos se favorece la activación de una respuesta de tipo celular, también denominada Th1 (IL-2, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\beta$ ), o de tipo humoral Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) [Abbas et al, 1996; Romagnani, 1997].

Las inmunoglobulinas pueden reconocer los antígenos en su conformación nativa, tanto en forma soluble como unidos a membrana. En cambio, el receptor de los linfocitos T (TCR) sólo puede reconocer fragmentos peptídicos derivados del antígeno que estén unidos a moléculas del MHC. Para ello, los antígenos procedentes de agentes externos han de ser internalizados, procesados y presentados por células especializadas. Las células con capacidad para captar y presentar antígenos exógenos (APCs, del inglés *antigen presenting cells*) son las células

dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B. Los péptidos resultantes del procesamiento intracelular del antígeno son presentados en la superficie de estas células, unidos a moléculas del MHC de clase II. Estos péptidos, situados en la hendidura de la molécula de MHC de clase II, podrán interactuar con el TCR de linfocitos T CD4+, mayoritariamente con función colaboradora. En contraposición, los linfocitos T CD8+ sólo pueden reconocer péptidos que sean presentados en el contexto de moléculas de MHC de clase I [Garda et al., 1999]. Las moléculas del MHC de clase I, presentes en la mayoría de las células de un organismo, presentan péptidos derivados de proteínas endógenas. Mediante este mecanismo, los linfocitos T citotóxicos pueden unirse a péptidos originados por un microorganismo patógeno intracelular.

En cualquier caso, y como se detallará más adelante, tanto la activación de los linfocitos T como de los linfocitos B depende de la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie de las células APCs. Los PRRs controlan la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie de estas células [Janeway, 1992]. De esta manera, la activación de la respuesta adaptativa queda regulada por la inmunidad innata, que es la que tiene capacidad para distinguir la potencialidad patogénica del antígeno.

## **1.2. TOLERANCIA**

Una de las características fundamentales de la inmunidad adaptativa es la elevada diversidad de los receptores de antígeno de los linfocitos (TCR en linfocitos T y BCR en linfocitos B). Éste es un factor fundamental que permite que los linfocitos puedan reconocer, potencialmente, cualquier antígeno extraño. La generación de esta diversidad de receptores se produce mediante procesos aleatorios de recombinación génica, durante la maduración de los linfocitos. Se estima que en un individuo puede haber del orden de  $10^9$  clones diferentes de linfocitos T y B.

Con esta extraordinaria diversidad de especificidades en el repertorio de linfocitos, resulta altamente probable la generación de clones con capacidad para reconocer agentes externos no patógenos e incluso moléculas del propio organismo.

La tolerancia se define como la falta de respuesta frente a un antígeno. En la mayoría de los casos, la presentación inicial del antígeno en unas condiciones “tolerizantes” previene la posterior activación de la respuesta inmunitaria frente a dicho antígeno.

En este sentido, existe un conjunto de mecanismos que tienen la función de asegurar la autotolerancia, que es la tolerancia inmunológica frente a antígenos propios del organismo (autoantígenos). Durante la maduración de los linfocitos en los órganos linfoides primarios (médula ósea para linfocitos B, y timo en el caso de los linfocitos T) tiene lugar un primer proceso de eliminación selectiva de aquellos linfocitos inmaduros con capacidad para

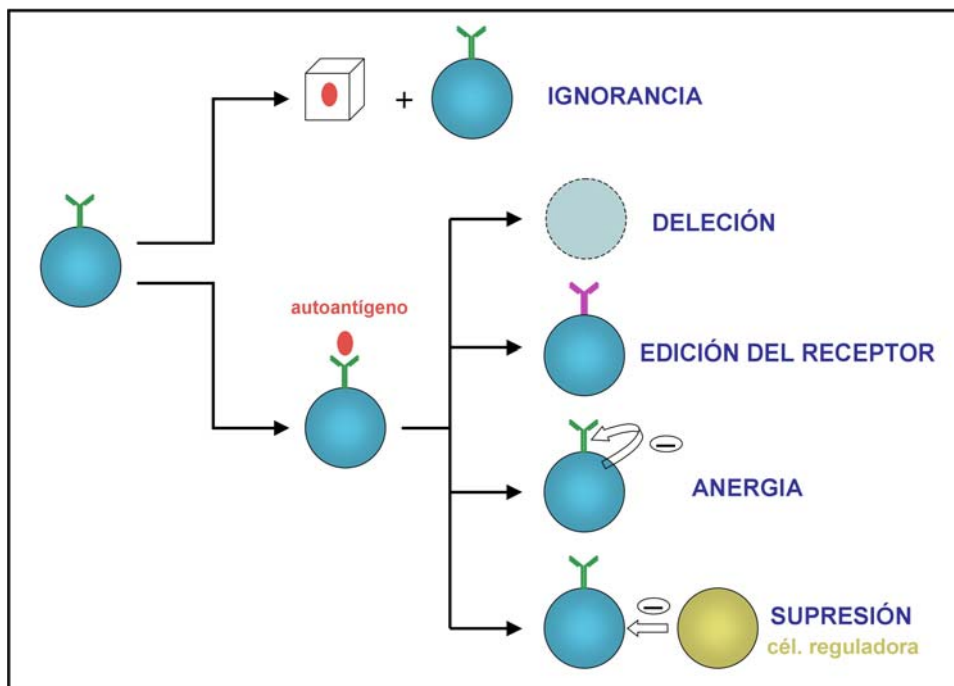
## I. Introducción

reconocer autoantígenos. De esta manera, se limita el número de células autorreactivas que son liberadas a la circulación. Este fenómeno, denominado **tolerancia central**, se genera principalmente ante antígenos ubícuos, que pueden estar presentes en éstos órganos linfoides primarios, y allí ser presentados a los linfocitos inmaduros. Sin embargo, existen algunos autoantígenos que no se encuentran expresados en los órganos linfoides primarios o que son reconocidos por los receptores de los linfocitos con baja afinidad. En consecuencia, son liberados a la circulación sanguínea linfocitos con capacidad autorreactiva. A este nivel, cuando tiene lugar el encuentro con los antígenos, en los órganos linfoides secundarios (bazo y ganglios linfáticos) o en otros tejidos periféricos no linfoides, los mecanismos de **tolerancia periférica** son los encargados de garantizar que estos linfocitos autorreactivos no lleguen a ser activados.

### 1.2.1. MECANISMOS DE TOLERANCIA

Existen diversos mecanismos activos de tolerancia que pueden actuar sobre los linfocitos T y B dependiendo de la accesibilidad y concentración del antígeno específico, así como del estado funcional de las células presentadoras de antígeno (APC) que lleven a cabo la presentación de dicho antígeno [Goodnow et al., 2005] (Fig. 1). Los mecanismos básicos que actúan en la inducción de tolerancia son los siguientes:

- **Ignorancia clonal:** algunos linfocitos autorreactivos no son activados, en condiciones normales, porque el antígeno que reconocen se encuentra “secuestrado” en ciertas localizaciones anatómicas donde se hace difícil su presentación.
- **Edición del receptor:** algunos linfocitos inmaduros, tras reconocer un autoantígeno, son inducidos a recombinar de nuevo el segmento variable de su receptor, produciéndose así un nuevo receptor con otra especificidad.
- **Delección clonal:** se basa en la eliminación, mediante apoptosis, de aquellos linfocitos autorreactivos.
- **Anergia:** en ocasiones los linfocitos autorreactivos no son eliminados, pero quedan en un estado anérgico, en el que se ve disminuida su capacidad para ser activados, quedando así funcionalmente silenciados.
- **Supresión:** otras células T con función reguladora pueden limitar la activación de los linfocitos autorreactivos.



**Figura 1.** Esquema gráfico de los diferentes mecanismos implicados en la adquisición de tolerancia a antígenos propios del organismo. La ignorancia clonal tiene lugar cuando el autoantígeno se encuentra “secuestrado” anatómicamente. La exposición crónica al autoantígeno conlleva la muerte celular inducida por la hiperactivación de los clones autorreactivos. En ciertos momentos del desarrollo de los linfocitos, el reconocimiento de un autoantígeno, por parte del receptor, puede activar de nuevo el mecanismo de recombinación génica. El encuentro con un antígeno, en condiciones de ausencia, o déficit, de estímulos coestimuladores conlleva la inducción de un estado de anergia en el propio linfocito, que dificulta su posterior activación. También otras células con funciones reguladoras y/o inhibitoras pueden impedir la activación de los linfocitos autorreactivos.

## 1.2.2. TOLERANCIA DE LINFOCITOS T

### 1.2.2.1. Tolerancia central de linfocitos T

#### 1.2.2.1.1. Selección positiva

Los precursores de los linfocitos T se originan en la médula ósea y migran al timo, donde alcanzan su madurez. En el timo, además, tiene lugar un proceso de selección de los timocitos (linfocitos T inmaduros), previo a la liberación de éstos al torrente circulatorio [Killeen et al, 1998]. Las células epiteliales de la corteza tímica presentan péptidos derivados de autoantígenos en el contexto de moléculas de MHC. Durante su paso por la corteza tímica, aquellos timocitos cuyo TCR no es capaz de interactuar adecuadamente con las moléculas de MHC vuelven a reordenar su TCR o son delecionados directamente [Nemazee et al, 2003].

## I. Introducción

Mediante este proceso de selección positiva, sólo aquellos timocitos que se pueden unir adecuadamente a las moléculas de MHC siguen su proceso de maduración en la médula tímica.

### 1.2.2.1.2. Selección negativa

En la médula, las células epiteliales medulares tímicas y las células dendríticas son las responsables de la presentación de autoantígenos a los timocitos, en presencia de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86). En esta fase, los timocitos son muy sensibles a la apoptosis por hiperactivación, de manera que aquellos que reconocen autoantígenos son eliminados “in situ” (selección negativa) [Palmer et al, 2003]. Además, cabe destacar que las células epiteliales medulares tímicas son capaces de expresar, de manera ectópica, autoantígenos que normalmente sólo se expresan en ciertos tejidos periféricos [Hanahan, 1998]. Esta expresión, regulada por el factor de transcripción AIRE, es imprescindible para la inducción de tolerancia de los linfocitos T frente a autoantígenos específicos de tejido [Anderson et al., 2002; Liston et al., 2003]. Tras estos procesos de selección positiva y negativa, sólo maduran y salen del timo aquellos linfocitos que pueden interactuar con moléculas de MHC pero no reconocen autoantígenos.

### 1.2.2.2. Tolerancia periférica de linfocitos T

En cualquier individuo, puede considerarse normal la presencia de algunos linfocitos T maduros, con capacidad autorreactiva, en circulación. Esto puede suceder si el reconocimiento del autoantígeno es de baja afinidad, por lo que no es eficientemente delecionado a nivel tímico. Alternativamente, es posible que el autoantígeno reconocido sea de expresión restringida a un tejido, y no haya sido presentado en el timo.

Por esta razón, resulta necesaria la existencia de mecanismos, fuera de los órganos linfoides primarios, que mantengan la autotolerancia. Estos mecanismos de tolerancia periférica se desarrollan a nivel de órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, sistema inmunitario cutáneo y de las mucosas) y en tejidos no linfoides.

#### 1.2.2.2.1. Delección clonal

Cuando el autoantígeno es abundante en periferia puede estimular de forma persistente al linfocito T autorreactivo. Esta activación repetida induce la coexpresión de la molécula Fas y su ligando FasL, en la membrana del linfocito T. La unión de Fas con su ligando, posible en la superficie de una misma célula, activa la cascada de señalización de las caspasas, que desemboca en la apoptosis final de la propia célula [Russell et al, 1993]. Este mecanismo se conoce como delección clonal.

La supervivencia de los linfocitos T maduros viene también determinada por la necesidad de recibir señalización mediante la citoquina IL-7. En condiciones normales, la homeostasis del número de linfocitos T es mantenida mediante unos niveles limitantes de IL-7 [Barthlott et al., 2003; Marrack et al, 2004]. En esta situación, el intento de expansión clonal de un linfocito T, reactivo frente a un autoantígeno, se verá limitado por la competencia por IL-7 [Strasser et al, 2003].

#### 1.2.2.2.2. *Anergia*

La completa activación de los linfocitos T requiere señales coestimuladoras, además de la interacción del TCR con el péptido correspondiente unido a una molécula de MHC. La principal vía coestimuladora de la activación de los linfocitos T es la molécula de superficie CD28. Ésta se une a las moléculas CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), expresadas en las células presentadoras de antígeno [Sharpe et al, 2002]. No obstante, las capacidades coestimuladoras de las células APC vienen determinadas por el contexto en que han captado el antígeno. En situaciones normales, en que no hay inflamación, determinantes de origen bacteriano, u otras señales que indiquen la presencia de agentes exógenos potencialmente patógenos, las células APC pueden captar y presentar antígenos pero no ven incrementadas sus capacidades coestimuladoras. En este contexto, si el autoantígeno es presentado a un linfocito T por una célula APC en ausencia de coestimulación (expresión de moléculas CD80 y CD86), resulta en una incapacidad de dicho linfocito para responder posteriormente al antígeno, quedando así en un estado de anergia. Se ha sugerido que la hiperexpresión de CD5, un receptor de superficie de tipo inhibitor, en estas células, puede ser la causante de la inhibición de la vía de señalización del TCR [Smith et al., 2001]. Estos linfocitos sólo pueden ser rescatados de este estado de anergia mediante una estimulación muy fuerte. De esta forma quedarían disponibles en caso de necesidad ante una posible infección [Goodnow, 1996].

También la activación persistente de los linfocitos T puede desembocar en un estado de anergia mediante la hiperexpresión del receptor de membrana CTLA-4, que se une a las moléculas de la familia B7 compitiendo con CD28 [Sharpe et al, 2002]. CTLA-4 es un receptor que transmite señales inhibitoras, silenciando así la funcionalidad de los clones hiperactivados [Ravetch et al, 2000].

#### 1.2.2.2.3. *Ignorancia inmunológica*

En ocasiones, el autoantígeno específico para algunos linfocitos T no se encuentra disponible para ser presentado a los linfocitos porque se encuentra presente sólo en muy bajas concentraciones o porque es específico de un tejido “secuestrado” anatómicamente del sistema inmunitario. Ciertas regiones anatómicas se consideran inmunoprivilegiadas, debido a que pueden trasplantarse tejidos sin inducir rechazo.

## I. Introducción

El sistema nervioso central es un claro exponente de tejido inmunoprivilegiado. La barrera hematoencefálica, no evita por completo entrada de linfocitos en el sistema nervioso central. No obstante apenas existen células APC intratisulares, y no existe un drenaje linfático que permita el transporte y presentación de autoantígenos procedentes de estos tejidos en ganglios linfáticos [Barker et al, 1977; Hart et al., 1981]. Además, las células neuronales, en condiciones normales, no expresan moléculas de MHC de clase I [Daar et al, 1984]. Todos estos factores hacen que, aunque los linfocitos T tengan acceso al tejido, difícilmente puedan ser activados.

Otros órganos como los testículos y la cámara anterior del ojo, presentan expresión constitutiva de FasL [Bellgrau et al., 1995; Griffith et al., 1995]. De esta manera, los linfocitos T que accedan a estos tejidos pueden ser eliminados mediante la inducción de apoptosis vía Fas-FasL.

### *1.2.2.2.4. Supresión por linfocitos T reguladores*

La activación de los linfocitos T maduros se encuentra, a su vez, bajo la regulación por parte de linfocitos T reguladores. Los linfocitos T reguladores tienen la capacidad de suprimir la respuesta inmunitaria, mediante su influencia sobre otras poblaciones de linfocitos T maduros. De esta manera, esta población celular interviene en la regulación de las respuestas inmunitarias, en la homeostasis celular, y en el control de las respuestas autorreactivas [Chatenoud et al., 2001; Sakaguchi, 2000; Shevach, 2000; Lohr et al., 2005]. Existen diversas poblaciones de células T reguladoras, las cuales presentan diferentes fenotipos y origen, así como distintos mecanismos de acción.

Las células T CD4+CD25+FoxP3+ son una población de linfocitos T reguladores que se origina a nivel tímico, y que representa un 5-8% de la población circulante de linfocitos T [Modigliani et al., 1996]. Éstas células, tras ser activadas por su antígeno específico, actúan inhibiendo la proliferación de otros linfocitos CD4+ y CD8+ [Thornton et al., 1998]. Esta acción inhibidora viene determinada por moléculas ancladas a la superficie celular, por lo que requiere la interacción directa célula-célula. No obstante, no es una acción supresora antígeno específica [Takahashi et al., 1998].

Otras poblaciones de linfocitos T reguladores no son constitutivas, sino que son inducidas, en función de las circunstancias en que les es presentado el antígeno. En este sentido, se ha descrito que la presentación del antígeno, por parte de células APC con escaso potencial coestimulador, productoras de IL-10 y/o TGF $\beta$ , puede inducir la aparición de células CD4+ reguladoras del tipo Tr1. Esta población de linfocitos reguladores Tr1 son, a su vez, también productores de IL-10 y TGF $\beta$ . Estas citoquinas, además de inhibir la inmunidad celular y la



inflamación, tienen un efecto de amplificación en la generación de nuevas células reguladoras [Roncarolo et al., 2001].

Existe un grupo de linfocitos T clasificados como Th3, que residen en la mucosa intestinal. Estos linfocitos Th3 producen TGF $\beta$  en respuesta a la estimulación antigénica [Faria et al., 1999]. De esta manera, se induce la tolerancia frente a la mayoría de antígenos que entran al organismo por vía oral.

Otro grupo de células T supresoras, caracterizadas por el fenotipo CD8+CD28-, actúan inhibiendo la producción de moléculas coestimuladoras B7 en las células APC. Así, en subsiguientes interacciones de estas células APC con otros linfocitos T, éstos quedan en un estado de anergia funcional [Chang et al., 2002].

Recientemente, se ha descrito también un papel regulador de la respuesta T por parte de poblaciones de linfocitos B específicos de antígeno, productores de IL-10 [Fillatreau et al., 2002].

### 1.2.3. TOLERANCIA DE LINFOCITOS B

#### 1.2.3.1. Tolerancia central de linfocitos B

##### 1.2.3.1.1. Edición del receptor

Los linfocitos B se originan y maduran en la médula ósea. Los linfocitos B inmaduros también son susceptibles a la inducción de tolerancia, si tiene lugar el encuentro con su antígeno específico. En esta situación, la interacción del receptor de antígeno del linfocito B con el antígeno puede inducir un nuevo reordenamiento de los genes que codifican para la cadena ligera de la inmunoglobulina, permitiendo así la adopción de una nueva especificidad [Nemazee et al., 2003].

##### 1.2.3.1.2. Delección clonal

En aquellos casos en que no tiene lugar la edición del receptor, o que ésta resulta en un nuevo BCR también con capacidad autorreactiva, la afinidad y naturaleza del autoantígeno son determinantes en la inducción de tolerancia [Goodnow et al., 1995]. Así, autoantígenos anclados a membrana o reconocidos por el receptor con alta avidéz pueden inducir la delección de los linfocitos B autorreactivos. La hiperactivación en estos linfocitos B inmaduros inhibe la expresión del factor de supervivencia BAFF (del inglés *B-cell-activating factor*) [Mackay et al., 2003] y/o la hiperexpresión del factor pro-apoptótico BIM (del inglés *BCL-2 interacting mediator of cell death*) [Strasser et al., 2003].

## I. Introducción

### 1.2.3.1.3. *Anergia*

Por el contrario, la unión del BCR a autoantígenos solubles, en los linfocitos B inmaduros, puede conllevar la inducción de un estado de anergia celular, caracterizado fenotípicamente por la disminución de la expresión del BCR en membrana. De esta manera, aunque los linfocitos B sean liberados a la circulación, éstos son incapaces de responder al antígeno [Cornall et al., 1995].

### 1.2.3.2. Tolerancia periférica de linfocitos B

Los linfocitos B maduros, para ser funcionalmente activados, requieren la sucesión de dos señales. Así, tras la interacción con el antígeno específico, necesitan la ayuda de linfocitos T colaboradores. Los linfocitos T colaboradores ayudan a la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, mediante la interacción CD40-CD40L y la producción de citoquinas como IL-2, IL-4 e IL-5 [Foy et al., 1996; Kovanen et al., 2004]. En consecuencia, la eliminación previa de clones T autorreactivos, llevada a cabo a nivel tímico, limita la posibilidad de que haya linfocitos T colaboradores que puedan ayudar a los linfocitos B autorreactivos.

#### 1.2.3.2.1. *Anergia*

El encuentro de los linfocitos B con el autoantígeno específico en ausencia de células T colaboradoras activadas deriva habitualmente en la inducción de anergia funcional. Mediante esta vía, los mecanismos de tolerancia que actúan sobre el repertorio de linfocitos T también regulan la autorreactividad de los linfocitos B, limitando la ayuda por parte de linfocitos T colaboradores.

El silenciamiento funcional de los linfocitos B autorreactivos se refleja, de forma característica, en la reducción drástica de los niveles de expresión del receptor de antígeno [Bell et al., 1994]. Alternativamente, algunos linfocitos B, tras interactuar con el autoantígeno inducen la expresión de CD5, un receptor de superficie que transmite señales inhibitoras sobre la vía de señalización del propio BCR [Hippen et al., 2000].

#### 1.2.3.2.2. *Exclusión folicular*

Los linfocitos B que interactúan con autoantígenos a nivel periférico, también pueden dejar de expresar receptores de localización (*homing receptors*), como CD62L. Este receptor es necesario para que los linfocitos B entren a formar parte de los folículos linfoides, en los órganos linfoides secundarios [Hartley et al., 1993]. Así, aunque un linfocito B autorreactivo llegue a periferia, si es excluido de los folículos linfoides, difícilmente podrá generar una respuesta efectora.

#### 1.2.3.2.3. Delección clonal

La interacción de los linfocitos B con linfocitos T autorreactivos activados, específicos para el mismo antígeno, puede derivar en la delección de los linfocitos B. En este caso, la expresión de FasL en la superficie de los linfocitos T activados, parece ser la responsable de la inducción de la apoptosis [Rathmell et al., 1995].

#### 1.2.3.2.4. Delección en los centros germinales

Dentro de los folículos linfoides, cuando se activa un clon de linfocitos B, se genera una reacción de centro germinal que implica procesos de proliferación, hipermutación somática, maduración de la afinidad y cambio de isotipo en las inmunoglobulinas producidas. Los linfocitos B resultantes de esta reacción, se diferencian a células B memoria o células plasmáticas productoras de anticuerpos. En esta situación es imprescindible la existencia de mecanismos que eviten que los nuevos receptores de antígeno, generados aleatoriamente mediante hipermutación somática, que reconozcan autoantígenos, deriven en clones B efectores [Goodnow et al., 2005]. A este nivel, la acción de los linfocitos T foliculares resulta crucial en la regulación de la supervivencia de los linfocitos B dentro del centro germinal, modulando los niveles de expresión de BIM, BAFF y FAS-L [Shokat et al., 1995; Pulendran et al., 1995; Han et al., 1995].

### 1.3. AUTOINMUNIDAD

Como se ha comentado anteriormente, los mecanismos de tolerancia central no son capaces de evitar por completo la maduración de linfocitos con capacidad autorreactiva. Por esta razón, en periferia se pueden encontrar linfocitos con capacidad para reconocer autoantígenos. No obstante, en condiciones normales, la activación de estos linfocitos es controlada por los mecanismos de tolerancia periférica.

Cuando existen alteraciones en los mecanismos de tolerancia, puede darse la activación de respuestas inmunitarias adaptativas, específicas contra antígenos propios. La respuesta autorreactiva iniciada por los linfocitos no puede desembocar en la eliminación final del antígeno, porque éste es producido continuamente por el propio organismo, de manera que se promueve una reacción continuada. En este contexto, las enfermedades autoinmunitarias son la consecuencia del daño tisular provocado por la inflamación local crónica.

Las enfermedades autoinmunitarias pueden definirse como **específicas de órgano**, cuando la distribución tisular del autoantígeno contra el que se desarrolla la respuesta se encuentra restringida a un órgano (Tabla 1).

## I. Introducción

**Tabla 1.** Enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano.

<b>Enfermedad autoinmunitaria</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Mecanismo efector</b>	<b>Signos clínicos</b>
Anemia hemolítica autoinmunitaria	Proteínas de la membrana eritrocitaria (grupo sanguíneo Rh, antígeno I)	La unión de los anticuerpos induce la fagocitosis y lisis por complemento	Hemólisis, anemia
Púrpura trombocitopénica autoinmunitaria	Integrina de la membrana plaquetaria (gpIIb:IIIa)	La opsonización por los anticuerpos favorece la fagocitosis de las plaquetas	Hemorragias
Granulomatosis de Wegener	Proteína de los gránulos de los neutrófilos activados (proteinasa-3)	La unión de los anticuerpos induce la degranulación de los neutrófilos y la inflamación local	Vasculitis, glomerulonefritis, hemorragia pulmonar
Pénfigo vulgar	Cadherina epidérmica (uniones intercelulares)	La unión de los anticuerpos activa la acción proteasa, que rompe las uniones intercelulares	Vesículas cutáneas
Síndrome de Goodpasture	Proteína de la membrana basal (colágeno de tipo IV)	La acumulación de anticuerpos promueve la inflamación local	Nefritis, hemorragia pulmonar
Fiebre reumática aguda	Antígenos miocárdicos	La unión de los anticuerpos induce la inflamación local	Miocarditis, degeneración de las válvulas cardíacas
Miastenia grave	Receptor nicotínico de la acetilcolina	La unión del anticuerpo bloquea la unión del neurotransmisor	Debilidad muscular, parálisis
Anemia perniciosa	Factor intrínseco de las células parietales gástricas	Los anticuerpos neutralizan el factor intrínseco, dificultando la absorción de vitamina B <sub>12</sub>	Anemia
Enfermedad de Graves	Receptor de la hormona estimulante de la tiroides	La unión del anticuerpo estimula de forma crónica el receptor	Hipertiroidismo
Diabetes de tipo 1	Antígenos de las células beta pancreáticas (insulina, GAD, IA-2, etc.)	Destrucción de las células beta mediada por linfocitos T citotóxicos	Déficit de insulina, diabetes
Esclerosis múltiple	Proteínas de mielina (MBP, PLP, MOG)	La inflamación local induce la destrucción de las vainas de mielina	Parálisis
Síndrome de Guillain Barré	Proteína P2 de la mielina del sistema nervioso periférico	Destrucción de los nervios periféricos	Parálisis
Tiroiditis de Hashimoto	Antígenos tiroideos: tiroglobulina y TPO	Inflamación de la tiroides: causa la destrucción tisular	Hipotiroidismo
Espondilitis anquilosante	?	Inflamación de las articulaciones vertebrales ileosacrales	Rigidez vertebral

Por el contrario, cuando el autoantígeno reconocido por las células autorreactivas presenta una distribución ubicua, la enfermedad presenta un carácter **sistémico** (Tabla 2). En ocasiones, aunque se haya activado la respuesta contra un autoantígeno de distribución ubicua, la accesibilidad del mismo puede determinar que la reacción autoinmunitaria sólo tenga lugar en un órgano [Davidson et al., 2001]. En el caso del síndrome de Goodpasture, la respuesta autoinmunitaria va dirigida contra el colágeno de tipo IV, que forma parte de la membrana basal. Este autoantígeno se encuentra ampliamente distribuido en las membranas basales del cuerpo, no obstante, sólo el endotelio fenestrado de los capilares glomerulares permite el acceso de los autoanticuerpos circulantes en plasma. Por esta razón la nefritis es el signo clínico más habitual en estos pacientes. En algunos casos, y especialmente en individuos fumadores, el daño en el endotelio capilar de los alvéolos pulmonares expone también la membrana basal al ataque autoinmunitario, lo cual puede derivar en hemorragias pulmonares [Donaghy, 1983].

**Tabla 2.** Enfermedades autoinmunitarias sistémicas.

Enfermedad autoinmunitaria	Antígeno	Mecanismo efector	Signos clínicos
Lupus eritematoso sistémico	DNA, nucleoproteínas	Inflamación causada por el depósito de inmunocomplejos	Vasculitis, artritis, nefritis
Artritis reumatoide	Antígeno desconocido en la sinovial articular	Inflamación local que estimula la producción de enzimas hidrolíticas	Destrucción articular
Síndrome de Sjögren	Ribonucleoproteínas	La inflamación mediada por anticuerpos causa la disfunción glandular	Sequedad de las mucosas (ojos, boca)

### 1.3.1. MECANISMOS PATOGENÉTICOS EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNITARIAS

Tanto los linfocitos T autorreactivos (respuesta inmunitaria celular) como los autoanticuerpos producidos por las células B (respuesta humoral) pueden producir lesiones tisulares, a menudo actuando conjuntamente en una misma patología. Es preciso tener en cuenta que, en los casos en los que el daño tisular viene determinado por factores humorales, a menudo el isotipo IgG presentado por los autoanticuerpos revela la colaboración de los linfocitos T CD4+ colaboradores en la activación de los linfocitos B autorreactivos. Por otro lado, en muchas enfermedades mediadas por linfocitos T citotóxicos, se detecta un alto título de autoanticuerpos en el suero de los pacientes, aunque no se haya demostrado ningún efecto directo de estos autoanticuerpos en la patogenia de la enfermedad. En algunos casos, incluso, se ha constatado que los mecanismos efectores del daño tisular pueden variar, a lo largo de la evolución del proceso autoinmunitario.

## I. Introducción

### 1.3.1.1. Autoanticuerpos

Los linfocitos B autorreactivos, al ser activados, pueden especializarse en la producción de anticuerpos. Estos autoanticuerpos circulantes pueden tener un efecto patogénico directo, a nivel local o sistémico, mediante diferentes mecanismos de acción.

#### *1.3.1.1.1. Formación de inmunocomplejos*

La unión de los anticuerpos a antígenos solubles, conlleva la formación de inmunocomplejos. Los inmunocomplejos que se forman a nivel circulatorio tienden a depositarse en las paredes vasculares, especialmente en los vasos sanguíneos de pequeño calibre. En los glomérulos renales y en la membrana sinovial se encuentran redes capilares en los que el plasma se somete a ultrafiltración (de la orina y el líquido sinovial, respectivamente). En esta situación también se favorece la acumulación de inmunocomplejos. Si el exceso de inmunocomplejos impide su total aclaramiento, o el individuo presenta algún déficit en la eliminación de los mismos, ésta acumulación en los lechos vasculares activa de forma crónica el sistema del complemento y la inflamación local (vasculitis, glomerulonefritis, artritis). Los neutrófilos atraídos al foco inflamatorio, serán en este caso los principales responsables de la lesión tisular. Este modelo de afectación autoinmunitaria sistémica es característico de pacientes afectados de lupus eritematoso sistémico (LES) [Mohan et al., 1995].

#### *1.3.1.1.2. Eliminación de la célula diana*

Los autoanticuerpos que reconocen moléculas presentes en la membrana de las células tienen función de opsonización, favoreciendo así su fagocitosis por parte de los macrófagos. A su vez, los anticuerpos unidos a la superficie de las células diana activan la vía del complemento, la cual induce una reacción inflamatoria local y la lisis directa de las células diana. La lisis mediada por la vía del complemento es responsable de la anemia hemolítica autoinmunitaria [Domen, 1998; Arndt et al., 1999], en la que los autoanticuerpos reconocen los antígenos del grupo sanguíneo Rh y el antígeno I, presentes en la membrana de los eritrocitos.

#### *1.3.1.1.3. Actividad pro-inflamatoria*

La fijación de dosis subclínicas de proteínas del complemento sobre las células de los tejidos, induce la inflamación. Asimismo, la inflamación también es promovida tras la interacción de autoanticuerpos que reconocen moléculas de la matriz extracelular, como se ha comentado anteriormente en el caso del síndrome de Goodpasture. En ambos casos, la inflamación local crónica es la causante del daño tisular.

#### *1.3.1.1.4. Activación/inhibición de receptores en la célula diana*

La unión de autoanticuerpos a receptores en la superficie celular puede interferir en la fisiología de las propias células. En la enfermedad de Graves los autoanticuerpos que se unen al receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSH) producen una estimulación continua. Esta activación induce la producción crónica de hormona tiroidea (TH), lo que origina el hipertiroidismo característico en estos pacientes [Feldman et al., 1992] .

Alternativamente, la unión de los anticuerpos a un receptor puede tener efecto bloqueante. La debilidad muscular observada en los pacientes con miastenia grave está causada por un bloqueo de la transmisión neuromuscular. En este caso los autoanticuerpos específicos contra la cadena  $\alpha$  del receptor nicotínico de la acetilcolina, bloquean la unión del neurotransmisor e inducen la internalización del propio receptor [Newsom Davis et al., 1991; Balasa et al., 2000].

#### *1.3.1.2. Linfocitos T*

La activación de la respuesta inmunitaria celular, dirigida contra antígenos propios, puede tener efectos patogénicos a través del efecto citotóxico de los propios linfocitos T o mediante la activación de otros elementos celulares.

##### *1.2.1.2.1. Efecto citolítico directo*

Los linfocitos T citotóxicos, mayoritariamente CD8+, son capaces de producir la muerte celular directa de las células diana. En este caso, las células que presentan el péptido específico unido a sus moléculas de MHC son eliminadas mediante apoptosis. La apoptosis celular puede ser mediada por diferentes mecanismos, que incluyen perforinas, granzima o Fas. La diabetes de tipo 1 se caracteriza por la destrucción selectiva de las células beta pancreáticas, productoras de insulina, por parte de células T efectoras. [Tisch et al., 1996].

##### *1.2.1.2.2. Inducción de la inflamación local*

Los linfocitos T colaboradores CD4+ de tipo Th1 y los CD8+, pueden inducir también el daño tisular, de forma indirecta, mediante la producción de citoquinas proinflamatorias. La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria sistémica que afecta especialmente a las articulaciones. No se conoce la especificidad de las células T autorreactivas responsables de esta patología. No obstante, se ha detectado la producción local de diversas citoquinas, por parte de linfocitos T activados y macrófagos, entre ellas TNF. Se postula que la producción de citoquinas proinflamatorias a nivel local induce la producción de enzimas hidrolíticas, por parte de las células sinoviales. Estas enzimas median la destrucción del cartílago de las articulaciones [Feldmann et al. 1996].

## I. Introducción

### 1.3.2. FACTORES GENÉTICOS DE SUSCEPTIBILIDAD AL DESARROLLO DE AUTOINMUNIDAD

El hecho de que la concordancia en la aparición de enfermedades autoinmunitarias sea mayor entre hermanos que en la población general sugiere la participación de los factores genéticos. Asimismo, la mayor concordancia entre gemelos monocigóticos que entre gemelos dicigóticos apoya también esta hipótesis. No obstante, incluso en el caso de gemelos monocigóticos, la concordancia de aparición de estas enfermedades es sólo del 20%. Este hecho evidencia también la participación de otros factores, de tipo ambiental, en la aparición de estas enfermedades.

#### 1.3.2.1. Enfermedades monogénicas

Algunas enfermedades autoinmunitarias se desencadenan a causa de una mutación en un único gen. Tal es el caso del síndrome autoinmunitario linfoproliferativo, el cual se presenta en individuos con una alteración en el gen *fas*, o en algún otro gen de la vía apoptótica mediada por Fas [Drappa et al., 1996; Davidson et al., 2001]. En estos casos, la resistencia de los linfocitos a la apoptosis mediada por Fas produce graves fallos en los mecanismos de autotolerancia, así como una hiperproliferación linfocitaria. En última instancia, estas alteraciones conllevan la aparición de múltiples afectaciones de origen autoinmunitario.

Por otro lado, mutaciones en el gen AIRE causan un síndrome de endocrinopatía poliglandular autoinmunitaria [Wang et al., 1998]. AIRE es el factor de transcripción responsable de la expresión ectópica de autoantígenos específicos de tejido, a nivel tímico. Así, defectos en este gen provocan una disfunción en los mecanismos de tolerancia central.

#### 1.3.2.1. Enfermedades poligénicas

La mayoría de enfermedades autoinmunitarias tienen un origen multigénico, por el cual determinadas combinaciones alélicas son capaces de conferir susceptibilidad o resistencia al desarrollo de este tipo de trastornos. La predisposición a desarrollar procesos de tipo autoinmunitario es el resultado, por lo tanto, de la conjunción de alelos promotores y protectores en cada individuo.

##### 1.3.2.1.1. Alelos HLA

Los péptidos, procedentes de antígenos endógenos o captados por las células APCs, son presentados a los linfocitos T, en el contexto de moléculas del MHC de clase I o de clase II, respectivamente. Las moléculas del MHC humano (HLA, del inglés *human leukocyte antigens*) presentan un gran polimorfismo poblacional. Los diferentes alelos de HLA presentan diferencias en el surco de unión a los péptidos. De esta manera, el haplotipo de HLA que



presenta un individuo, repercute directamente en la capacidad de presentar un determinado repertorio antigénico.

Entre las características genéticas asociadas al desarrollo de patologías autoinmunitarias, se ha descrito ampliamente la contribución decisiva de las moléculas del MHC. Así, se ha observado que ciertos haplotipos de HLA se encuentran asociados a diferentes patologías autoinmunitarias, mientras que otros confieren resistencia a las mismas (Tabla 3). La asociación más fuerte descrita hasta el momento se encuentra entre el alelo HLA-B27 (MHC de clase I) y la espondilitis anquilosante [Schwimbeck et al., 1987; Taurog et al., 1999]; los individuos portadores de este alelo tienen hasta 90 veces mayor probabilidad de desarrollar esta enfermedad inflamatoria, que un individuo que carezca de este alelo. No obstante, en la mayoría de enfermedades autoinmunitarias se ha descrito una importante asociación con el haplotipo de la moléculas de MHC de clase II, especialmente en el locus DR. Estos datos sugieren que ciertos haplotipos tienen mayor capacidad para presentar determinados péptidos, procedentes de autoantígenos, a células T autorreactivas [Gautam et al., 1994].

**Tabla 3.** Asociación del fenotipo HLA con la susceptibilidad a padecer ciertas enfermedades autoinmunitarias.

Enfermedad autoinmunitaria	Alelo HLA asociado	Riesgo relativo
Espondilitis anquilosante	<b>B27</b>	90
Esclerosis múltiple	<b>DR2</b>	5
Enfermedad de Graves	<b>DR3</b>	4
Miastenia grave	<b>DR3</b>	3
Lupus eritematoso sistémico	<b>DR2</b>	6
Diabetes de tipo 1	<b>DR3/DQ2 Y DR4/DQ8</b>	5-25
Artritis reumatoide	<b>DR1 Y DR4</b>	5
Pénfigo vulgar	<b>DR4</b>	15
Síndrome de Goodpasture	<b>DR2</b>	16
Tiroiditis de Hashimoto	<b>DR5</b>	3

Riesgo relativo: Probabilidad de desarrollar la enfermedad en los individuos con determinado alelo HLA, en comparación con los individuos que carecen de dicho alelo.

#### 1.3.2.1.2. Otros genes de susceptibilidad

Se ha observado que la probabilidad de desarrollar una misma enfermedad autoinmunitaria, en hermanos gemelos idénticos, es mayor que entre hermanos que comparten el mismo haplotipo HLA. Este hecho demuestra que existen otros factores genéticos, además del MHC, que también son decisivos en el desarrollo de la autoinmunidad.

## I. Introducción

Se han asociado polimorfismos en diversos genes, con la aparición de enfermedades autoinmunitarias [Encinas et al., 2000]. Muchas de las moléculas para las que se han definido alelos de susceptibilidad/resistencia intervienen en el desarrollo de las respuestas inmunitarias. Tal es el caso de citoquinas, correceptores de antígenos, moléculas coestimuladoras, factores moduladores de la apoptosis, proteínas del complemento, moléculas involucradas en vías de señalización, etc. [Vyse et al, 1996].

En los individuos afectados por lupus eritematoso sistémico (LES), se ha descrito un aumento en la expresión de la molécula CD40L, responsable de la coestimulación de los linfocitos B [Desai-Mehta et al., 1996]. Asimismo se ha observado la hiperexpresión del factor de supervivencia BAFF [Zhang et al., 2001]. Otras alteraciones en la inducción de apoptosis y en las vías de señalización del BCR, también disminuyen el umbral de activación necesario para la supervivencia y activación de los linfocitos B en estos individuos [Rathmell et al., 1995; Huck et al., 2001]. Además, estos pacientes también suelen presentar defectos en las poblaciones de linfocitos T reguladores [Tomer et al., 1989], así como en proteínas de la vía del complemento [Walport, 2001]. En conjunto, la presencia de diversas alteraciones genéticas en estos pacientes promueve la activación de los linfocitos B que producen anticuerpos contra un amplio repertorio de autoantígenos, a la vez que dificultan la eliminación de los inmunocomplejos generados. La acumulación de estos inmunocomplejos promueve la inflamación vascular, característica de esta enfermedad.

Algunos alelos de susceptibilidad se ven asociados a varias patologías de origen autoinmunitario, lo cual indica que diversas enfermedades comparten mecanismos patogénicos comunes. Por esta misma razón, en algunas ocasiones, diferentes enfermedades autoinmunitarias suelen presentarse dentro de una familia, e incluso en el mismo paciente. En este sentido, se ha descrito que ciertas variantes alélicas de CTLA-4 están asociadas con la aparición de diabetes de tipo 1, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves [Awata et al., 1998; Kouki et al., 2000]. Estos polimorfismos de CTLA-4 presentan diferentes capacidades para ejercer su función inhibidora. Debido al papel decisivo que desempeñan los linfocitos T colaboradores (CD4+) en la regulación del resto de poblaciones linfocitarias, defectos en la tolerancia de los linfocitos T se pueden ver reflejados, a su vez, en la activación de linfocitos T autorreactivos citotóxicos y/o linfocitos B productores de autoanticuerpos.

Por otro lado, como se ha demostrado en modelos animales de miocarditis, la vulnerabilidad del órgano diana también puede venir determinada genéticamente, haciéndolo más sensible frente al daño tisular mediado por la respuesta inmunitaria [Liao et al, 1995].

### 1.3.2.1.3. Factor hormonal

La mayoría de enfermedades autoinmunitarias son más frecuentes en mujeres que en hombres. Así, la susceptibilidad a presentar lupus eritematoso sistémico o esclerosis múltiple, por ejemplo, es diez veces mayor en mujeres que en hombres. Se ha demostrado que los factores hormonales, en especial los estrógenos, son clave en la susceptibilidad a la autoinmunidad, ya que favorecen la potenciación de las respuestas inmunitarias adaptativas [Wilder, 1996]. Se ha comprobado que la aparición de estas enfermedades es más habitual entre la menarquía y la menopausia, coincidiendo con la etapa fértil, en que el nivel de estas hormonas es más elevado. De hecho, en el modelo murino de lupus, la cepa (NZB X NZW)F1, se ha demostrado que la administración exógena de estrógenos exacerba la enfermedad [Bynoe et al., 2000].

### 1.3.3. FACTORES INICIADORES DE RESPUESTAS AUTORREACTIVAS

Los factores genéticos pueden conferir susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. Pero, como se ha comentado anteriormente, incluso en el caso de individuos genéticamente idénticos, la concordancia de aparición de estas enfermedades no supera el 20%. Estos datos indican la participación de otros factores, extrínsecos al individuo, en el desarrollo de la autoinmunidad.

Se han descrito diversos factores ambientales capaces de inducir el fracaso de la tolerancia periférica sobre uno o varios autoantígenos, iniciando así la activación de la respuesta autoinmunitaria. En algunos casos estas enfermedades son autolimitadas ya que, cuando desaparece el factor inductor de la respuesta autoinmunitaria, ésta también finaliza. En otras ocasiones, sin embargo, la propia producción continua de los autoantígenos reconocidos por esta respuesta, mantiene y potencia la autoinmunidad.

#### 1.3.3.1. Infecciones

Diversas infecciones, de origen vírico y/o bacteriano, pueden tener un efecto promotor en la activación de respuestas autoinmunitarias. En la mayoría de los casos el microorganismo infeccioso es el responsable de desencadenar el inicio de la respuesta autoinmunitaria, pero luego, ésta es mantenida y amplificada por los propios autoantígenos. De esta manera, cuando la enfermedad autoinmunitaria se hace clínicamente detectable puede que la infección ya haya terminado. De hecho, incluso puede darse la situación de que la infección no haya afectado al órgano que después resulta ser la diana del ataque autoinmunitario. Los agentes infecciosos pueden promover el fracaso de la tolerancia periférica contra determinados autoantígenos mediante diferentes mecanismos, entre los que se incluye el mimetismo molecular, la ruptura de la anergia y la liberación de autoantígenos inmunológicamente secuestrados [Aichele et al., 1996; Rocken et al., 1992].

## I. Introducción

### 1.3.3.1.1. *Mimetismo molecular*

En ocasiones se ha descrito la semejanza molecular entre epítomos antigénicos de un microorganismo infeccioso con antígenos propios, esta situación puede desencadenar la activación de linfocitos con reactividad cruzada. Este mecanismo se denomina mimetismo molecular [Oldstone, 1987; Zhao et al., 1998].

Se ha observado que, en algunos individuos genéticamente susceptibles, se desarrolla un cuadro de fiebre reumática tras sufrir una infección por *Streptococcus*. En estos casos, la existencia de una posible reacción cruzada entre un polisacárido de la pared celular de *Streptococcus* y la miosina del músculo cardíaco, es la causa de que se active esta respuesta autoinmunitaria [Guilherme et al., 1995; Malkiel et al., 2000].

También un efecto de mimetismo molecular es el responsable del desarrollo del Síndrome de Guillain-Barré, en algunos individuos, tras haber sufrido una enteritis causada por *Campylobacter jejuni*. En este caso los lipopolisacáridos de la pared bacteriana presentan reactividad cruzada con gangliósidos que forman parte de la mielina de los nervios periféricos, lo cual promueve su destrucción [Yuki, 1999].

### 1.3.3.1.2. *Reversión del estado de anergia o de la ignorancia clonal*

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de linfocitos potencialmente autorreactivos es normal en cualquier individuo. Pero los mecanismos de tolerancia periférica previenen la activación de estos linfocitos, principalmente mediante la inducción de anergia o ignorancia inmunológica. La inflamación local, provocada por una infección, puede conducir a la activación de las APCs. La hiperexpresión de moléculas coestimuladoras en estas APCs activadas puede conducir a la reversión de la anergia en las células autorreactivas, hasta el momento silenciadas. [Horwitz et al., 1998].

El modelo de estudio de la esclerosis múltiple es la encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE). Esta patología de origen autoinmunitario puede ser inducida, en cepas murinas susceptibles, mediante la administración exógena de proteínas de la mielina, acompañadas de adyuvante completo de Freund [Miller et al., 1994; Neumann et al., 1997]. La tolerancia inmunológica frente a autoantígenos específicos del sistema nervioso central se mantiene mediante ignorancia inmunológica, ya que en estos tejidos existe una ausencia de células con capacidad presentadora de antígenos. No obstante, si se induce la activación de la respuesta autoinmunitaria contra proteínas de la mielina, aunque ésta tenga lugar en otra localización anatómica, los linfocitos activados pueden migrar al sistema nervioso central y allí establecer una reacción inflamatoria [Anderton et al., 2002].

Por otro lado, se ha hipotetizado que infecciones causadas por rotavirus podrían influir en el desarrollo de la autoinmunidad, ya que estas infecciones enterovirales producen alteraciones en la permeabilidad intestinal, pudiendo influir en la tolerancia frente a antígenos procedentes de la dieta [Couper, 2001].

#### 1.3.3.1.3. Activación policlonal

Ciertos microorganismos, como es el caso de *Mycoplasma* o el virus *Epstein-Barr*, pueden promover una activación policlonal de los linfocitos [Dziarski, 1988]. También componentes de la pared bacteriana, como el LPS se ha comprobado que tienen esta capacidad estimuladora inespecífica sobre los linfocitos B. Entre los linfocitos activados pueden encontrarse algunos con especificidad autorreactiva. En estos casos, la respuesta autoinmunitaria puede ser perpetuada por los propios autoantígenos.

#### 1.3.3.1.4. Liberación de autoantígenos

Una infección puede producir un daño tisular que libere antígenos propios hasta el momento "secuestrados", ante los cuales no se había desarrollado un proceso activo de tolerancia. Así, autoantígenos que hasta el momento habían sido sencillamente ignorados, pueden llegar a interactuar con células autorreactivas específicas, en esta situación.

En el caso de los individuos afectados por granulomatosis de Wegener, el antígeno reconocido por los autoanticuerpos (proteínasa-3), sólo es expresado en neutrófilos activados. Por tanto, la unión de los anticuerpos al autoantígeno sólo es posible cuando éstos son activados, por ejemplo, en caso de infección. Sólo en esta situación los autoanticuerpos pueden promover la degranulación de los neutrófilos y la liberación de radicales libres, causantes de la vasculitis característica de esta patología [Pinching et al., 1980; Kallenberg et al., 1994].

#### 1.3.3.2. Alteraciones tisulares

Lesiones tisulares de diferente origen pueden contribuir también a la liberación de autoantígenos ignorados por el sistema inmunitario. Tal es el caso de la liberación de autoantígenos de origen ocular tras un traumatismo. En estos casos se puede desarrollar lo que se denomina una oftalmia simpática, es decir, un ataque autoinmunitario que afecta al ojo sano [Streilein et al., 1997].

En ocasiones, el desarrollo de neoplasias también induce la liberación de los autoantígenos previamente ignorados por el sistema inmunitario. Por esta razón ciertos tumores se asocian con el desarrollo de determinadas enfermedades autoinmunitarias [Darnell, 1996]. A modo de ejemplo, el desarrollo de timomas es el origen de aproximadamente un 10% de los casos de miastenia grave [Marx et al., 2003].

## I. Introducción

### 1.3.3.3. Factores dietéticos

Diferentes componentes de la dieta pueden también contribuir al desarrollo de procesos autoinmunitarios. Un buen ejemplo es la gliadina, componente del gluten de los cereales. Esta proteína es un substrato de la enzima transglutaminasa. El complejo formado por la unión de estas dos proteínas tiene capacidad inmunogénica. De esta manera, se induce, en individuos susceptibles, la producción de anticuerpos contra ambas proteínas [Dieterich et al., 1997]. Como consecuencia de este proceso, se producen lesiones inflamatorias intestinales, que desembocan en una atrofia de las vellosidades intestinales y malabsorción (enfermedad celíaca). En este caso, la eliminación del gluten de la dieta, es suficiente para conseguir la remisión de la inflamación del intestino.

### 1.3.3.4. Fármacos

Algunos fármacos también pueden funcionar como haptenos, uniéndose a autoantígenos y confiriéndoles capacidad inmunogénica. Las penicilinas y las cefalosporinas, por ejemplo, tienen la capacidad de unirse a ciertos componentes de la membrana de los eritrocitos, generando así neoantígenos [Arndt et al., 1999]. La unión de estos anticuerpos a la superficie celular promueve la lisis mediada por complemento, lo que conduce a una anemia hemolítica. Otros fármacos, como la procainamida, inducen también un síndrome autoinmunitario similar al lupus eritematoso [Blomgren et al., 1972; Yung et al., 1995].

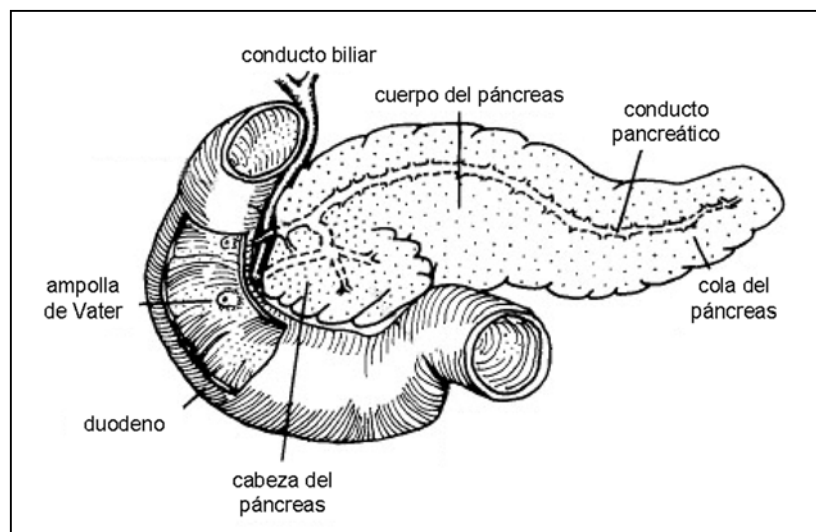
### 1.3.3.5. Factores estocásticos

Individuos genéticamente idénticos (como es el caso de las cepas murinas congénicas, o gemelos univitelinos), con susceptibilidad genética a autoinmunidad, bajo la influencia de los mismos factores ambientales, muestran discordancia en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. La causa de esta diversidad individual radica en el hecho de que existen también factores estocásticos que influyen en el desarrollo de estas enfermedades. Uno de estos factores aleatorios tiene su origen en el reordenamiento en los genes de los receptores de los linfocitos (TCR y BCR). La aleatoriedad en este reordenamiento es necesaria para proveer al individuo de un repertorio de linfocitos suficientemente diverso como para ser potencialmente capaz de reconocer cualquier antígeno extraño. De esta manera, es en cierta medida una cuestión de azar que un individuo, aunque siendo genéticamente susceptible a presentar procesos autoinmunitarios, acabe presentando linfocitos con potencial autorreactivo. Por otro lado, la activación de estos linfocitos autorreactivos también dependerá del momento en el que se hayan generado: durante la infancia y la pubertad, o durante un proceso infeccioso, por ejemplo, se dan unas condiciones fisiológicas más propicias para el desarrollo de respuestas autoinmunitaria (liberación de neoautoantígenos, etc.)

## 2. DIABETES TIPO 1

### 2.1. EL PÁNCREAS

El páncreas es un órgano de forma alargada, situado entre el estómago y el asa duodenal. Se distinguen tres zonas: la cabeza es la parte más gruesa y se localiza en la curva del duodeno, el cuerpo del páncreas es la zona intermedia y la cola es el extremo proximal al bazo (Fig. 2). El páncreas se encuentra conectado al duodeno a la altura de la ampolla de Vater, donde desembocan el conducto pancreático y el conducto biliar.



**Figura 2.** Esquema de un páncreas humano. Adaptado de Slack et al., 1995

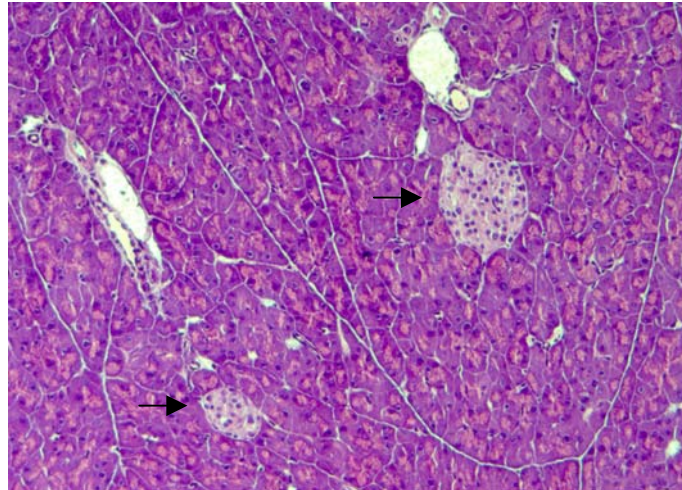
El páncreas es un órgano glandular mixto, pues tiene tanto misión endocrina, al segregar hormonas, como misión exocrina, al producir enzimas digestivas. La porción endocrina del páncreas, que representa alrededor del 1-2% del tejido pancreático, está constituida por los islotes de Langerhans (también denominados islotes pancreáticos), formados por grupos de células aisladas entre los túbulos glandulares de la porción exocrina (Fig. 3A).

En los islotes pancreáticos se distinguen cuatro tipos de células secretoras de hormonas (Fig. 3B):

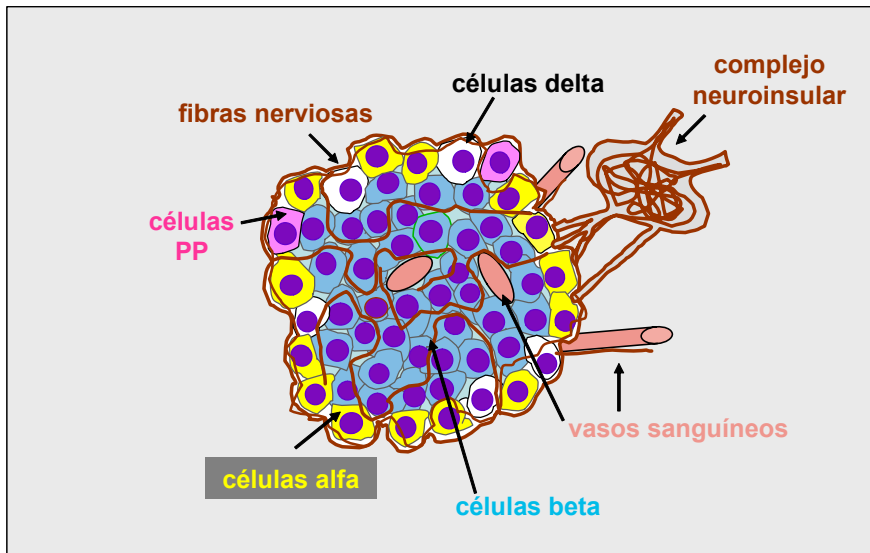
- las **células beta**, que producen insulina, y constituyen un 70% del islote
- las **células alfa**, que secretan glucagón, y representan un 20% del islote
- las **células delta**, productoras de somatostatina, que ocupan un 5-10% del islote
- el 2% restante corresponde a las **células PP**, productoras de polipéptido pancreático

Los islotes se encuentran densamente vascularizados e inervados. La inervación autónoma de los islotes, compuesta por nervios simpáticos, parasimpáticos y sensoriales, además de células gliales, forman una compleja red que envuelve y penetra en los islotes [Ahren, 2000].

A



B



**Figura 3. A.** Tejido pancreático de ratón teñido con hematoxilina y eosina. Las flechas señalan los islotes pancreáticos, que se encuentran rodeados de tejido exocrino. (X100) **B.** Esquema de la organización de un islote pancreático.

Insulina y glucagón son las hormonas encargadas de controlar el nivel de glucosa en la sangre. La insulina estimula el consumo de glucosa por las células, además de incrementar el anabolismo de las proteínas, de manera que disminuye la glucemia. En cambio, la acción hiperglucemiante del glucagón se debe a que esta hormona estimula la glucogenólisis en el hígado. La secreción de estas dos hormonas depende, sobretodo, de la concentración de glucosa en la sangre, pero también de la acción paracrina que las hormonas endocrinas ejercen en los propios islotes. A su vez, el control nervioso local es también esencial en la regulación de la secreción endocrina [Salvioli et al., 2002].



## 2.2. LA DIABETES TIPO 1 EN HUMANOS

La diabetes mellitus tipo 1 (T1D, del inglés *type 1 diabetes*), clásicamente denominada insulino dependiente o diabetes juvenil, es una enfermedad de origen autoinmunitario, que se caracteriza por la destrucción de las células beta, productoras de insulina, de los islotes pancreáticos [Tisch et al., 1996]. Existe un primer periodo subclínico, que puede durar meses e incluso varios años, durante el cual se produce una inflamación de los islotes, denominada insulinitis, que se acompaña de una pérdida progresiva de la masa celular beta [Gepts, 1965; Foulis et al., 1986], con la consiguiente disminución en la producción de insulina. Aunque los individuos, en esta fase, aún mantienen la normogluceemia, se puede detectar un defecto en la liberación inmediata de insulina, mediante la realización de un test de tolerancia a glucosa por vía intravenosa. Como se detalla más adelante, en esta etapa suele ser detectable la presencia de autoanticuerpos antiislote en suero. El debut clínico de la enfermedad, tras la destrucción de un 90-95% de las células productoras de insulina [Daaboul et al., 2003], se caracteriza por la aparición de hipergluceemia, cetoacidosis, glucosúria, poliúria y polidipsia. Los individuos afectados por esta enfermedad pasan a depender, de por vida, de la administración de insulina exógena, para controlar su gluceemia en la medida de lo posible. A pesar de ello, y como resultado de la hipergluceemia a largo plazo, se producen lesiones vasculares progresivas que dan lugar a graves secuelas: insuficiencia renal, ceguera, neuropatía y obstrucciones arteriales que pueden concluir en gangrena.

### 2.2.1. EPIDEMIOLOGÍA

La T1D es una de las enfermedades crónicas severas más frecuentes actualmente: en nuestro país se diagnostican cada año unos 12-20 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, según la región. La T1D suele aparecer de forma abrupta, durante la infancia o la adolescencia, encontrándose la máxima incidencia entre los 10 y los 14 años.

Aunque se estima que esta enfermedad afecta a 1 de cada 300 niños en el mundo, la distribución geográfica es ampliamente heterogénea. Se ha sugerido, de forma general, un gradiente norte-sur en la incidencia de la T1D; siendo especialmente frecuente en países del norte de Europa (40 casos nuevos por año por cada 100.000 habitantes, en Finlandia), intermedia en el resto de Europa y Estados Unidos (4-20), y poco frecuente en América del Sur, África y Asia (menos de un caso anual por cada 100.000 habitantes) [Diabetes Epidemiology Research International Group, 1988; Karnoven et al., 2000]. El análisis de la variación que los movimientos migratorios producen en la incidencia de la T1D en una población, ha permitido confirmar la influencia de las condiciones ambientales en estas diferencias geográficas [Maclaren et al., 1992]. Los datos existentes apoyan la denominada “hipótesis de la higiene”, según la cual la mejora en las medidas higiénicas y sanitarias, en los países más desarrollados, aumenta la incidencia de enfermedades de origen autoinmunitario,

## I. Introducción

así como las de base alérgica [Gale et al., 2002; Feillet et al., 2004]. Se ha sugerido que la exposición a microbios y parásitos, principalmente durante la infancia, estimula la correcta maduración del propio sistema inmunitario.

Por otra parte, cabe resaltar el hecho de que el estudio multicéntrico EURODIAB, indica que la incidencia de T1D en Europa se está viendo incrementada del orden de un 3-4% anual, especialmente en los niños de edades comprendidas entre los 0 y los 4 años [EURODIAB ACE Study Group, 2000; Soltesz, 2003].

### 2.2.2. HISTOPATOLOGÍA

Los estudios histopatológicos realizados en páncreas de individuos afectados de T1D, aunque no muy abundantes a causa de la dificultad en la disponibilidad de muestras, han revelado que los linfocitos infiltrantes en estos pacientes son predominantemente células T CD8+ [Itoh et al., 1993]. En este ambiente local de inflamación se ha caracterizado la prevalencia de citoquinas de tipo Th1, promotoras de la respuesta celular citotóxica [Somoza et al., 1994; Huang et al., 1995]. Paralelamente, se ha detectado hiperexpresión de moléculas de MHC de clase I en las células endocrinas, así como de moléculas asociadas al procesamiento antigénico endógeno (transportador de antígenos TAP-1), lo cual se ha relacionado con la posibilidad de que estas células sean sujeto de una infección vírica [Somoza N, et al., 1994; Vives-Pi et al., 1995; Vives-Pi et al., 1994]. Además, se ha descrito que las células beta pancreáticas son especialmente sensibles al efecto tóxico de las citoquinas pro-inflamatorias, en comparación con las células alfa insulares o las células acinares exocrinas [Seewaldt et al., 2000]. Por lo tanto, en una situación de inflamación local, las células beta serían las más dañadas, favoreciéndose así la liberación y presentación de autoantígenos específicos de células beta.

Aunque no se conoce cuál es el factor desencadenante de la respuesta autoinmunitaria en los individuos que desarrollan T1D, se hipotetiza la existencia de un agente inicial que afecte a la viabilidad de las células beta pancreáticas. De esta manera se favorecería la liberación al medio de nuevos autoantígenos, que podrían activar linfocitos autorreactivos [Atkinson, 2005].

La mayor parte de la información de que se dispone, acerca de los mecanismos patogénicos que actúan en la diabetes tipo 1, proviene de estudios realizados en el modelo animal NOD (del inglés Non-Obese Diabetic). Estos mecanismos serán detallados más adelante, en el apartado referente al desarrollo de la T1D en ratones NOD.

### 2.2.3. ETIOLOGÍA

Al igual que ocurre en otras enfermedades autoinmunitarias, la susceptibilidad individual a desarrollar T1D tiene un componente genético, ya que se observa una predisposición hereditaria a presentar la enfermedad. Aún así, la concordancia de aparición de la enfermedad

en hermanos gemelos monocigóticos es sólo de un 50% . Este hecho indica que los factores genéticos heredados no explican completamente la aparición de la enfermedad, sino que también intervienen otros factores ambientales en el inicio del proceso autoinmunitario [Tisch et al., 1996].

#### 2.2.3.1. Factores genéticos

Hasta el momento, mediante análisis de ligamiento, se han descrito 22 loci génicos que presentan asociación con la aparición de la T1D (Tabla 4).

Aunque unos loci de susceptibilidad/resistencia parecen tener más influencia que otros, ninguno es suficiente ni estrictamente necesario para el desarrollo de la enfermedad; el riesgo de desarrollar diabetes depende de la combinación de alelos de susceptibilidad y alelos de resistencia presentes en el genoma de un individuo [Vyse et al.,1996; Buzzetti et al., 1998; Todd et al., 2001].

##### 2.2.3.1.1. Genes de la región HLA

Entre los genes implicados en la T1D, cabe destacar especialmente el locus que comprende el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) [Nerup et al., 1974], que se corresponde con la nomenclatura IDDM1. La concordancia de T1D entre hermanos es de aproximadamente un 6%. Sin embargo, en los hermanos portadores del mismo HLA, la concordancia se incrementa hasta el 20%. Estos datos reflejan la gran influencia del haplotipo HLA en la susceptibilidad/resistencia genética a esta enfermedad.

Aunque se describió primero la asociación de la T1D con alelos HLA de clase II DR3 y DR4, hoy se conoce que la mayor parte de esta asociación se debe al ligamiento entre DR y DQ. Los genotipos asociados con mayor susceptibilidad a presentar la enfermedad son DR3-DQ2 y DR4-DQ8. El análisis molecular de estos genotipos ha demostrado que la presencia del aminoácido aspártico (Asp) en la posición 57 del locus DQ $\beta$  (MHC de clase II) proporciona resistencia a la diabetes, mientras que la presencia de una serina (Ser) en esta posición aporta susceptibilidad [She, 1996]. La importancia de estos genes en el desarrollo de la enfermedad viene dada por la influencia que tienen las moléculas de MHC sobre el repertorio de antígenos que pueden ser presentados por las APCs [Wucherpfenning, 1995; Kwok, 1996]. Por otro lado, cabe tener en cuenta la posible influencia de la propia naturaleza del péptido antigénico que sea presentado vía MHC, ya que éste puede favorecer la desviación de la respuesta hacia Th1 o Th2, favoreciendo así o inhibiendo, respectivamente, la activación de una respuesta inmunitaria de tipo celular [Tisch et al., 1996].

## I. Introducción

**Tabla 4.** Loci génicos asociados con predisposición a la T1D en humanos. La nomenclatura IDDM (del inglés *insulin dependent diabetes mellitus*) hace referencia a aquellos loci que han sido localizados mediante análisis de ligamiento genético en estudios de asociación familiar. Se destaca con negrita aquellos loci cuya asociación con T1D se ha demostrado en diversas poblaciones. Adaptado de Smink et al., 2005.

Locus	Cromosoma	Genes candidatos
<b>IDDM1</b>	6	<b>HLA-DRB1</b> , PSMB8, PSMB9, TAP1, TAP2, BRNL2, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DPB1, TAPBP
<b>IDDM2</b>	11	<b>INS</b> , IGF2
<b>IDDM3</b>	15	
<b>IDDM4</b>	11	LRP5, C11orf23, C11orf24, GAL, MS4A2
<b>IDDM5</b>	6	
<b>IDDM6</b>	18	BCL2, TNFRSF11A
<b>IDDM7</b>	2	CALCRL, TFPI
<b>IDDM8</b>	6	C6orf208, CLL1, KIAA1838, PDCD2, PHF10, PSMB1, TPB, CCR6
<b>IDDM9</b>	3	CP, IL12A, AGTR1
<b>IDDM10</b>	10	CXCL12, GAD2, CREM, MAP3K8, NRPQ, PAPD1, TCF8
<b>IDDM11</b>	14	
<b>IDDM12</b>	2	CD28, <b>CTLA-4</b> , ICOS
<b>IDDM13</b>	2	PTPRN
<b>IDDM15</b>	6	C6orf4, FYN
<b>IDDM17</b>	10	CASP7
<b>IDDM18</b>	5	IL12B
<b>Cromosoma 1 (sin nomenclatura)</b>	1	
<b>Cromosoma 16 (sin nomenclatura)</b>	16	IRF8
<b>Cromosoma 8 (sin nomenclatura)</b>	8	
<b>Cromosoma X (sin nomenclatura)</b>	X	
<b>Sin nomenclatura</b>	1	<b>PTPN22</b>
<b>Sin nomenclatura</b>	10	IL2RA

### 2.2.3.1.2. Otros loci de susceptibilidad

Dentro del locus IDDM2 se ha descrito la asociación de polimorfismos en la región promotora del gen de la insulina (INS) con el riesgo de desarrollar T1D [Bell et al., 1984]. En la región 5' de este gen se encuentran un número variable de repeticiones en tándem (VNTR, del inglés *variable number of tandem repeats*), que influyen en el nivel de transcripción génica [Bell et al., 1982; Hammond-Kosack, 1993]. Se ha observado que el alelo de mayor longitud confiere resistencia a la T1D [Lucassen et al., 1993; Bennett et al., 1995]. Parece ser que la influencia de

este locus en el desarrollo de la diabetes se debe a diferencias en el nivel de expresión de insulina a nivel tímico [Vafiadis et al., 1995; Pugliese et al., 1995]. Se postula que una mayor expresión del gen de la insulina en timo, asociada al alelo de mayor longitud, favorece la inducción de tolerancia en células T específicas para este autoantígeno [Todd et al., 2001].

El gen que codifica para CTLA-4 es un fuerte candidato a ser el responsable de la susceptibilidad asociada al locus IDDM12. Como se ha comentado anteriormente, CTLA-4 es un receptor de linfocitos T que se une a las moléculas correceptoras de las células APCs (CD80 y CD86), activando una cascada de señalización inhibitoria, que limita la capacidad proliferativa de los propios linfocitos T. Se han asociado polimorfismos en este gen con la aparición de T1D en algunas poblaciones, pero la base molecular de este efecto aún no se encuentra del todo definida [Marron et al., 1997; Ueda et al., 2003].

Recientemente, también se han encontrado evidencias de que alelos en el gen PTPN22 se encuentran asociados con T1D [Bottini et al., 2004; Maier et al., 2005]. Este gen codifica para LYP, una fosfatasa implicada en procesos de supresión de la activación del desarrollo de los linfocitos T, de manera que ciertas variantes en este gen conllevan una desregulación en la activación de los linfocitos T.

En el resto de loci, aún no se ha identificado, de forma concluyente, el gen responsable de la susceptibilidad a la T1D. No obstante, numerosos genes han sido sugeridos como candidatos por su posible papel en la regulación de la respuesta inmunitaria (Tabla 4) [Smink et al. 2005]. Asimismo, también se ha postulado la posible influencia de la carga genética individual, en la susceptibilidad de las células beta pancreáticas a la apoptosis [Kukreja et al., 1999] o en su capacidad de regeneración [Biaison-Lauber et al., 2005; Homo-Delarche et al., 2004a].

Contrariamente, en otros casos se conoce el efecto fenotípico causante de la susceptibilidad a la T1D, pero no se ha encontrado la base genética del mismo. En este sentido, estudios comparativos de gemelos monocigóticos discordantes para diabetes autoinmunitaria, revelan que se suelen presentar unos niveles mucho menores de células T restringidas para CD1 (para las cuales se ha descrito función reguladora) en los hermanos afectados [Wilson et al., 1998].

### 2.2.3.2. Factores ambientales

Como se ha comentado anteriormente, la susceptibilidad a la T1D no puede explicarse totalmente en base a los factores genéticos. Entre los factores ambientales que han sido relacionados con la diabetes autoinmunitaria destacan las infecciones víricas y la dieta.

## I. Introducción

### 2.2.3.2.1. Infecciones víricas

La incidencia estacional de la T1D, siendo ésta más frecuente en otoño e invierno [Gamble et al., 1969], se ha relacionado con la posibilidad de que las infecciones víricas estén relacionadas con el desarrollo de esta enfermedad. La detección de RNA viral y/o anticuerpos específicos contra ciertos virus en el suero de algunos pacientes de T1D de reciente diagnóstico [Lonnrot et al., 2000; Banatvala et al., 1985], así como la detección de interferones (IFNs) de tipo 1 (típicamente antivirales) en el páncreas de pacientes diabéticos, apoyan también esta hipótesis [Foulis et al., 1987; Somoza et al. 1994; Huang et al., 1995]. No obstante, la mayoría de estas evidencias son sólo indirectas.

Se postula que ciertas infecciones podrían inducir el desequilibrio de la autotolerancia, activando así linfocitos autorreactivos que hubieran escapado a la selección negativa a nivel de órganos linfoides primarios [Jun et al., 2003]. Algunos casos clínicos aportan indicios sobre la influencia de diversos tipos de infecciones víricas (rotavirus, picornavirus, Coxsackie A, retrovirus, virus de la rubéola, virus de la coriomeningitis) en el desarrollo de T1D. No obstante, el análisis de la influencia de las infecciones en el desarrollo de la T1D es controvertido, ya que resulta complicado discriminar qué infección en particular, de todas las que ha sufrido un individuo a lo largo de su vida, puede haber tenido influencia en la potenciación de la respuesta autoinmunitaria [von Herrath et al., 2001].

Las infecciones víricas pueden iniciar la respuesta autoinmunitaria mediante varios mecanismos [Alba et al., 2005]. Se ha sugerido que ciertas infecciones podrían tener un efecto citopático directo sobre las células beta pancreáticas, de manera que se facilitase la liberación de autoantígenos capaces de estimular linfocitos autorreactivos. Alternativamente, la inflamación local provocada por una infección, puede alterar el microambiente insular, aumentando los niveles de citoquinas proinflamatorias, moléculas de MHC y moléculas coestimuladoras, favoreciendo así la activación policlonal de los linfocitos T [Vives-Pi et al., 1995]. Hasta la fecha, sólo un grupo ha conseguido aislar un agente vírico (Coxsackie B4) de un páncreas de un paciente diabético [Yoon et al., 1979]. No obstante, hay que tener en cuenta que la infección viral puede ser sólo un agente iniciador de la respuesta autoinmunitaria, y que ésta puede perpetuarse en base a la continua presencia de autoantígenos, prescindiendo ya de la infección inicial que la generó.

En otras situaciones, no se considera necesario que la infección vírica afecte directamente a las células diana. Para algunos virus (virus Epstein-Barr, retrovirus, Coxsackie B4) se ha descrito una similitud molecular con epítomos pertenecientes a autoantígenos específicos de células beta [von Herrath et al., 2001]. El mimetismo molecular, en estos casos, puede favorecer que los mismos linfocitos T que se activan para eliminar la infección vírica, ataquen también a las células beta pancreáticas.

#### 2.2.3.2.2. Factores dietéticos

La dieta también parece tener influencia en el desarrollo de diabetes. Ha sido ampliamente estudiada la influencia de la introducción de albúmina bovina (BSA), a través de la leche de sustitución, en los primeros meses de vida [Borch-Jensen et al., 1984], ya que la BSA parece presentar cierta homología estructural con un autoantígeno de islote pancreático (ICA69). Sin embargo, los datos obtenidos hasta el momento no muestran una asociación clara entre el aumento de la susceptibilidad a T1D y la exposición a antígenos de la leche de vaca, a edades tempranas [Norris et al., 1996; Couper et al., 1999]. Contrariamente, algunas hipótesis defienden que estos datos son el reflejo de la influencia beneficiosa por parte de la leche materna durante los primeros meses de vida. La leche materna es una fuente importante de factores de crecimiento, citoquinas y anticuerpos maternos. Estos factores son importantes para proteger al niño de infecciones, así como para regular la maduración del sistema inmunitario de la mucosa intestinal [Xanthou et al., 1995]. Por esta razón, la rápida sustitución de la leche materna por otros productos, podría conllevar cambios en la tolerancia/respuesta inmunológica ante los antígenos procedentes de la dieta.

Otros factores dietéticos como la introducción de cereales en la dieta infantil, o el elevado consumo de edulcorantes, cafeína e incluso alimentos ahumados, han sido también asociados con la susceptibilidad a desarrollar T1D, en algunos estudios [Atkinson, 2005].

Un efecto indirecto de la dieta es la influencia de ésta en el índice de masa corporal. Un elevado índice de masa corporal ha sido propuesto como factor de riesgo a desarrollar T1D: es destacable que la incidencia de diabetes, tanto de tipo 1 como de tipo 2 (insulino independiente y de origen metabólico), en el mundo occidental ha aumentado paralelamente a la de la obesidad. De hecho se conoce que el sobrepeso y la inactividad física aumentan la resistencia insulínica, así como la tasa de apoptosis de las células beta. Así, se favorecería la liberación y presentación de autoantígenos [Wilkin, 2001].

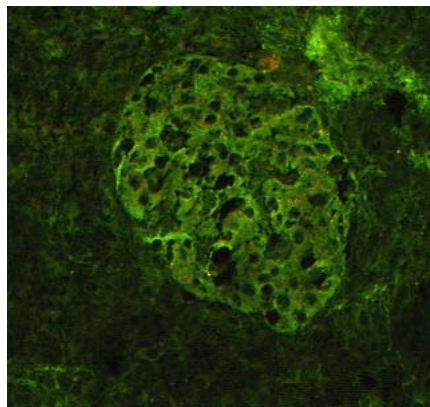
#### 2.2.4. AUTOANTICUERPOS

Aunque la T1D se ha descrito como una enfermedad autoinmunitaria mediada por mecanismos efectores de tipo celular, se pueden detectar altos títulos de autoanticuerpos contra antígenos propios de células de islote en el suero de los pacientes, antes de que hagan aparición los primeros síntomas clínicos. Sin embargo, no se conoce si estos autoanticuerpos tienen un papel directo en la patogénesis de la enfermedad. Más bien se considera que son originados secundariamente, como consecuencia de la destrucción de las células beta por parte de los linfocitos T, y posterior liberación de antígenos intracitoplasmáticos. Así, podrían considerarse como un reflejo, detectable en periferia, del ataque autoinmunitario que se está desarrollando en los islotes pancreáticos. De hecho, en etapas más avanzadas de la diabetes,

## I. Introducción

estos autoanticuerpos tienden a desaparecer, lo que indica la destrucción total de los islotes y la consecuente atenuación de la correspondiente respuesta autoinmunitaria.

La presencia de cantidades anormalmente elevadas de autoanticuerpos contra antígenos de islote pancreático, en los sueros de pacientes con T1D, fue descrita por primera vez por Bottazo et al. en 1974. En ese momento se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas, y gracias a ellas se detectaron los denominados ICA (del inglés *islet cell antibodies*). Pero esta técnica presentaba dificultades de estandarización, principalmente por la variabilidad entre los donantes de páncreas [Landin-Olsson M, 1990]. Estos ICA engloban un conjunto de autoanticuerpos contra diferentes antígenos presentes en el citoplasma de las células beta pancreáticas (Fig.4), los cuales fueron estudiados en mayor profundidad en los años 80 y 90, utilizando extractos fraccionados de islotes [Atkinson et al., 1993]. De esta manera se identificaron la insulina [Palmer et al., 1983], GAD [Baekkeskov et al., 1990] e IA-2 [Lan et al., 1996] como las dianas correspondientes a los autoanticuerpos mayoritarios en los ICAs de individuos prediabéticos. Desde entonces se ha ampliado considerablemente el panel de autoantígenos para los que se ha encontrado respuesta humoral en pacientes diabéticos o prediabéticos, gracias a la aplicación de técnicas de expresión de librerías de cDNA, incluyéndose entre ellos moléculas de diverso origen tisular y con variada naturaleza molecular (carboxipeptidasa H, DNA topoisomerasa II, glima38, GLUT2, GM2-1, GT3, HSP-60, HSP-70, HSP-90, amilina, ICA69, Jun-B, SOX13, sulfatide) [Lieberman et al., 2003] (Tabla 5).



**Figura 4.** Detección de ICAs (*islet cell antibodies*) en suero, mediante inmunofluorescencia sobre tejido pancreático. Detalle de un islote. (x200)

Actualmente, se evalúa la presencia en suero de anticuerpos contra diversos autoantígenos concretos (insulina, GAD65, IA-2, IA-2 $\beta$ ) mediante técnicas de radioinmunoensayo (RIA) estandarizadas a nivel mundial, como marcadores diagnóstico y/o pronóstico [Maclaren et al., 1999; Pietropaolo et al. 2001]. Con estas técnicas, se detecta la presencia de autoanticuerpos antiislote en un 85-90% de los pacientes en el momento del debut clínico. La ausencia de



autoanticuerpos en el resto de pacientes, en el momento del diagnóstico, puede ser debida a la ausencia real de tales marcadores o, posiblemente, al desconocimiento de ciertos autoanticuerpos que por tanto no son analizados actualmente. En este sentido, el avance en el estudio de otros autoantígenos implicados en la T1D podría conllevar un perfeccionamiento de estas técnicas analíticas, mejorando así la eficiencia del diagnóstico y predicción de esta enfermedad.

**Tabla 5.** Listado de los autoantígenos para los se ha descrito respuesta humoral (autoanticuerpos en suero) y/o respuesta T en pacientes con T1D. Están indicados con signo negativo aquellos antígenos para los que no se ha descrito, hasta el momento, la respuesta inmunitaria humoral/celular. Adaptado de Lieberman et al., 2003.

ANTÍGENO	DISTRIBUCIÓN	AUTOANTICUERPOS	RESPUESTA CEL. T
Insulina	Células beta	+	CD4+ y CD8+
GAD65	Neuroendocrino	+	CD4+ y CD8+
IA-2	Neuroendocrino	+	CD4+ y CD8+
IA-2 $\beta$	Neuroendocrino	+	-
GAD67	Neuroendocrino	+	-
Carboxipeptidasa H	Neuroendocrino	+	-
DNA Topoisomerasa II	Ubicuo (nuclear)	+	-
Glima 38	Neuroendocrino	+	-
GLUT2	Ubicuo	+	-
GM2-1	Neuroendocrino	+	-
GT3	Neuroendocrino	+	-
HSP-60	Ubicuo (inducible)	+	CD4+
HSP-70	Ubicuo (inducible)	+	CD4+
HSP-90	Ubicuo (inducible)	+	-
Amilina	Células beta	-	CD8+
ICA69	Neuroendocrino	+	CD4+
Imogen38	Ubicuo	-	CD4+
Jun-B	Ubicuo (nuclear)	+	CD4+
S100 $\beta$	Neuroendocrino	-	CD4+
SOX13 (ICA12)	Ubicuo (nuclear)	+	-
Sulfatide	Neuroendocrino	+	-
Reg	Páncreas	+	-

## I. Introducción

La producción de autoanticuerpos puede comenzar en individuos muy jóvenes, incluso en el primer año de vida [Wucherpfennig et al., 2001a]. En las primeras fases del desarrollo de la enfermedad, la diversidad de autoanticuerpos que se detectan es escasa. Los primeros que suelen aparecer son los anticuerpos contra insulina (IAA, del inglés *insulin autoantibodies*), presentes en casi un 100% de los niños prediabéticos [Rewers et al., 1996; Yu et al., 2000; Eisenbarth, 2003]. También aparecen pronto los anticuerpos contra GAD65 (decarboxilasa del ácido glutámico) e IA-2 (proteína tirosina fosfatasa) [Verge et al., 1996]. A medida que avanza la insulinitis y, a su vez, la destrucción de las células productoras de insulina, aumenta la diversidad de autoanticuerpos detectables (Tabla 5). Este efecto se conoce con el nombre de “diversificación antigénica” (*antigenic spreading*).

La mera presencia en suero de autoanticuerpos contra un antígeno de islote no implica necesariamente que un individuo vaya a padecer T1D, de hecho puede considerarse dentro de la normalidad. Sin embargo, se ha observado que la aparición de múltiples autoanticuerpos específicos para diversos autoantígenos se asocia con un alto riesgo a sufrir la enfermedad, posiblemente como reflejo de la propia destrucción de los islotes durante la etapa subclínica. De hecho, en familiares de primer grado de pacientes de T1D, que presentan positividad para los tres autoanticuerpos comentados anteriormente (insulina, GAD65 e IA-2), el riesgo de desarrollar diabetes es casi del 100% [Lieberman et al., 2003].

### 2.2.5. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Tras el diagnóstico clínico de la T1D, el tratamiento habitual consiste en la administración de insulina exógena, con el fin de mantener, en la medida de lo posible, unos niveles adecuados de glucosa en sangre. Sin embargo, teniendo en cuenta que la enfermedad se hace manifiesta durante la infancia, se hace muy difícil evitar por completo las consecuencias derivadas de la hiperglucemia a largo plazo, fundamentalmente causadas por lesiones microvasculares, que son las que influyen negativamente, de manera más significativa, en la calidad de vida de los afectados.

Puesto que en muchos casos el desarrollo preclínico de la enfermedad puede durar años, y que incluso en el momento de la aparición clínica de la enfermedad aún queda un remanente activo de células beta pancreáticas productoras de insulina (10-20%), aún queda un margen de tiempo en el que es posible diagnosticar la diabetes (o incluso prediabetes) y aplicar tratamientos que eviten la completa destrucción de los islotes pancreáticos. Es por esto que se hace esencial la aplicación de tratamientos preventivos en las etapas tempranas de la enfermedad; tanto en individuos prediabéticos en los que la detección de autoanticuerpos en suero indica un alto riesgo de desarrollar la enfermedad, como en pacientes de reciente debut.

En este sentido, y en base al conocimiento del que se dispone actualmente sobre la inmunopatología de esta enfermedad, se han desarrollado varias estrategias dirigidas a la protección y regeneración de la propia célula beta, así como a la regulación de la respuesta autoinmunitaria. En la mayoría de los casos, los tratamientos han sido diseñados y ensayados previamente en modelos animales de diabetes autoinmunitaria, especialmente en el modelo de ratón NOD. Sin embargo, de las casi 200 estrategias terapéuticas descritas hasta la fecha, con capacidad para prevenir o retardar la aparición de la diabetes en NOD, la mayoría han fracasado en los ensayos clínicos [Roep and Atkinson, 2004].

Se han ensayado, sin éxito hasta el momento, tratamientos basados en la administración de agentes protectores de las células beta, como la nicotinamida, cuyos efectos *in vitro* y en modelos murinos habían sido previamente demostrados [Lampeter et al., 1998]. Otras actuaciones terapéuticas, por el contrario, han sido dirigidas hacia la inmunomodulación del sistema inmunitario. En primer lugar, cabe señalar que se ha descartado la utilización de inmunosupresores del amplio espectro (del tipo ciclosporina o azatioprina) en el tratamiento de la T1D, ya que los efectos adversos de estos tratamientos son considerables y no compensarían su beneficio. No obstante, se han ensayado con cierto éxito, otros inmunomoduladores que inducen el desarrollo de células T reguladoras, como el anticuerpo monoclonal anti-CD3 o la vitamina D [Mathieu C, et al., 2005]. En el caso del anticuerpo anti-CD3 se ha comprobado que induce en los pacientes un efecto de tolerancia inmunológica a medio plazo (al menos 18 meses), capaz incluso de revertir la diabetes [Herold et al., 2002; Bisikirska and Herold, 2004]. También se han ensayado estrategias de inducción de tolerancia antígenoespecífica; de esta manera se ha usado insulina, GAD65 y HSP60, bien en forma de proteína completa o de péptidos, administrados por diferentes vías (oral, nasal, subcutánea, parenteral) con la intención de inducir una tolerancia específica [Ablamunits et al., 1998; Alleva et al., 2002; The diabetes prevention trial-type 1 study group, 2002 and 2005; Raz et al., 2001; Tisch et al., 1999], pero hasta ahora los resultados no han sido esperanzadores, posiblemente porque ninguno de éstos autoantígenos es la única diana de la respuesta autoinmunitaria.

Alternativamente, algunos trabajos recientes sostienen que, en estados avanzados de la diabetes, aún se mantiene una población de células beta viable, aunque temporalmente inhibidas, y que, junto con la capacidad de regeneración de células beta a partir de células ductales, podrían restablecer la producción de insulina, si se consigue bloquear la respuesta autoinmunitaria [Palmer et al., 2001; Holland et al., 2004; Nishio et al., 2006]. En este sentido, está en desarrollo la utilización de factores de regeneración que puedan estimular la recuperación de la propia masa celular beta (INGAP, exendina), a partir de células beta residuales, células progenitoras ductales o incluso células madre.

Parece, por tanto, que las alternativas terapéuticas futuras probablemente se basarán en terapias combinadas, que sumen un beneficio regenerador de las células beta pancreáticas, a la vez que una regulación de la respuesta autoinmunitaria [Atkinson, 2005].

### **2.3. MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA T1D**

Hasta la fecha, han sido pocos los estudios realizados sobre tejido pancreático humano, durante la etapa prediabética, puesto que la biopsia pancreática no es una práctica clínica habitual en la mayoría de países. No obstante, la inaccesibilidad de estas muestras ha propiciado el desarrollo de métodos alternativos en el estudio de la etiopatogenia de la T1D, como los modelos animales inducidos, espontáneos o transgénicos.

Los modelos animales han sido fundamentales en el conocimiento de la diabetes. En los años 20, los canadienses Banting y Best descubrieron la implicación de la insulina en la diabetes, a partir de estudios en perros pancreatectomizados. Desde entonces, y hasta la década de los 50, los estudios basados en modelos animales de diabetes inducida mediante métodos quirúrgicos fueron fundamentales para el avance del conocimiento anatómico y fisiológico del páncreas [Barthold, 2004].

Posteriormente, se desarrollaron técnicas de inducción de hiperglucemia mediante tratamientos con toxinas como la estreptozotocina o el aloxano, que afectan selectivamente a las células endocrinas. La administración de una dosis elevada de estreptozotocina induce diabetes en roedores, por efecto tóxico directo sobre las células beta pancreáticas. Alternativamente, en ciertas cepas susceptibles, pequeñas dosis consecutivas de estreptozotocina induce una diabetes en la que se observa infiltrado leucocitario a nivel insular [Rees and Alcolado, 2005]. Estos modelos han sido fundamentales en el estudio de la apoptosis de las células beta, la hiperglucemia y sus complicaciones derivadas, así como en el desarrollo de nuevas formas de tratamiento. También han permitido el desarrollo de técnicas de trasplante de islotes.

Más adelante, ya en los años 80, diferentes grupos de investigadores derivaron diversas líneas consanguíneas de roedores, mediante la selección de los individuos hiperglucémicos. De esta manera se generó la cepa de ratón NOD (Non-Obese Diabetic), así como la rata BB (BioBreeding). Ambos modelos se caracterizan por el desarrollo de diabetes de origen autoinmunitario, de forma espontánea.

Los modelos animales que se describen a continuación, en este capítulo, se definen como cepas consanguíneas, lo que significa que todos los individuos son genéticamente idénticos (homocigotos para todos los loci). Esto permite que en los estudios sobre la T1D, realizados con estos modelos, no influyan las diferencias interindividuales causadas por factores genéticos, lo cual simplifica el análisis de la enfermedad.

### 2.3.1. EL RATÓN NOD

La cepa murina NOD (Non-Obese Diabetic) ha sido el modelo animal más ampliamente utilizado en el estudio de la diabetes mellitus tipo 1, desde que fue descrito en 1980 [Makino et al., 1980], ya que desarrolla T1D de forma espontánea, presentando características similares a la enfermedad descrita en humanos (presencia de células T CD4+ y CD8+ autorreactivas, autoanticuerpos antiislote). Si bien todos los individuos pertenecientes a la cepa NOD son genéticamente iguales, y todos presentan insulinitis a partir de las 3-5 semanas de edad, no todos ellos acaban desarrollando diabetes clínica. Bajo las condiciones ambientales adecuadas (especialmente si se mantienen en condiciones libres de patógenos) aproximadamente un 80% de las hembras y un 20% de los machos NOD acaban desarrollando, de forma espontánea, diabetes tipo 1, antes de las 30 semanas de edad, presentándose los primeros casos a partir de las 12 semanas.

Este modelo se caracteriza por mostrar susceptibilidad, a su vez, al desarrollo de otros síndromes autoinmunitarios. Este hecho se refleja en la aparición de infiltrado de células del sistema inmunitario en diferentes órganos, principalmente en glándulas endocrinas y exocrinas (insulinitis, adrenalitis, tiroiditis, sialitis y paratiroiditis) [Beales et al., 2002]. Esta propensión a la autoinmunidad tiene un origen multifactorial; los factores ambientales se suman a los factores genéticos, principalmente el haplotipo de MHC de clase II (H-2 I-A<sup>g7</sup>), para generar y desarrollar las respuestas autoinmunitarias [Wicker et al., 1992].

Este modelo, además de un amplio repertorio de modelos transgénicos derivados de esta cepa, ha sido, y sigue siendo, fundamental en el conocimiento del desarrollo de la diabetes autoinmunitaria a diferentes niveles; identificación de los loci génicos que confieren resistencia/susceptibilidad a la diabetes, factores endógenos y externos que modulan el desarrollo de la enfermedad, y análisis de los mecanismos inmunológicos implicados en la respuesta autoinmunitaria contra las células beta pancreáticas.

#### 2.3.1.1. Factores genéticos de susceptibilidad / resistencia

Como se ha comentado anteriormente, en referencia a la T1D humana, diversos factores genéticos y ambientales tienen un efecto determinante en el desarrollo de la diabetes en los modelos animales. La amplia disponibilidad para estudiar individuos genéticamente iguales, a partir de los modelos consanguíneos, la comparación con cepas que no desarrollan diabetes, y la posibilidad de producir nuevos modelos transgénicos, ha facilitado la identificación de los diferentes genes implicados en el desarrollo de la diabetes autoinmunitaria, en la cepa NOD. Hasta el momento se han descrito 26 loci asociados con el desarrollo de T1D en este modelo murino, denominados con la nomenclatura *Idd* (del inglés *insulin-dependent diabetes*) (Tabla 6) [Serreze et al., 2001; Smink et al., 2005].

## I. Introducción

**Tabla 6.** Loci que influyen en la susceptibilidad a T1D en el modelo murino NOD. Se indican con negrita aquellos genes cuya asociación con T1D en este modelo murino ha sido ampliamente contrastada. Adaptado de Eisenbarth, 2005 y Maier et al., 2005.

Locus genético	Cromosoma	Genes Candidatos
<b>Idd1</b>	17	<b>MHC de clase II (I-A<sup>97</sup>)</b>
<b>Idd2</b>	9	
<b>Idd3</b>	3	IL-2, IL-21
<b>Idd4</b>	11	PAF-AH1b1, NOS2, quimiocinas CC
<b>Idd5.1</b>	1	<b>CTLA-4</b>
<b>Idd5.2</b>	1	NRAMP1
<b>Idd6</b>	6	Complejo NK: Lrmp, Bcat1, Kras2
<b>Idd7</b>	7	
<b>Idd8</b>	14	
<b>Idd9</b>	4	VAV3, CD30, TNFR2, CD137
<b>Idd9.1</b>	4	JAK1, LCK
<b>Idd9.2</b>	4	TNFR2, CD30
<b>Idd9.3</b>	4	CD137
<b>Idd10</b>	3	CD101
<b>Idd11</b>	4	
<b>Idd12</b>	14	
<b>Idd13</b>	2	<b>β-2 microglobulina</b>
<b>Idd14</b>	13	
<b>Idd15</b>	5	XMV65
<b>Idd16</b>	17	<b>MHC de clase I (H-2<sup>K</sup>), MAPK13, MAPK14</b>
<b>Idd17</b>	3	
<b>Idd18</b>	3	VAV3, PTPN8

Al igual que se ha observado en humanos, el principal loci de susceptibilidad a la diabetes se encuentra en los genes que codifican para las moléculas del MHC (*Idd1*): el ratón NOD presenta un aminoácido serina (Ser) en la posición 57 de su cadena I-Aβ (el homólogo murino de DQβ), correspondiente al alelo H-2 I-A<sup>97</sup>, mientras que otras cepas no susceptibles a T1D

presentan un aminoácido aspártico (Asp) [Vyse and Todd, 1996; Todd and Wicker, 2001]. La homología estructural entre los alelos de susceptibilidad correspondientes a las moléculas de MHC de clase II, IDDM1 en humanos (DQ8) e *Idd1* en ratón (I-A<sup>g7</sup>), demuestra una importante semejanza en los procesos de presentación antigénica mediadores de la T1D, en ambas especies [Wucherpfennig et al., 2001b]. A pesar de que la presencia de este alelo se ha demostrado que es esencial, no es suficiente en sí misma, para el desarrollo de la diabetes en ratón.

Existen otros loci de susceptibilidad en el ratón NOD, cuya influencia se suma a la de *Idd1*, para conferir susceptibilidad a la diabetes. Los genes candidatos localizados en algunos de estos *loci* están relacionados con la homeostasis de la respuesta inmunitaria; dentro de estos loci se ha observado una clara asociación entre el *locus Idd5.1* y el gen de CTLA-4 [Ueda et al., 2003], así como una posible asociación entre los genes de NRAMP1 y de IL-2 o IL-21 con los *loci Idd5.2* e *Idd3*, respectivamente [Ikegami et al., 2003]. En algunos de estos loci, el alelo de resistencia a diabetes también confiere protección ante el ataque inmunitario a otros tejidos (tiroides, glándulas salivares), lo cual sugiere que pueden estar implicados en mecanismos generales de autotolerancia o regulación de la respuesta inmunitaria (células reguladoras, citoquinas Th1/Th2) [Todd et al., 2001]. Por otro lado, se hipotetiza la existencia de genes de susceptibilidad relacionados exclusivamente con la fisiología de la célula beta, ya que en algunos casos el alelo de resistencia a la T1D no tiene influencia sobre otros trastornos autoinmunitarios.

#### 2.3.1.2. Factores externos

Las condiciones de estabulación en las que se mantiene una colonia de ratones NOD, es crucial en la incidencia y edad de aparición de la diabetes en la misma [Pozzili et al., 1993]. Se ha observado que variaciones en la temperatura, humedad ambiental, régimen de horas de luz/oscuridad, o en la dieta pueden alterar la frecuencia de aparición de la diabetes. Por otro lado, un factor importante a tener en cuenta es la composición del pienso administrado a los animales: el contenido en derivados de cereales es determinante, ya que contienen componentes propuestos como diabetogénicos (gliadina) [Coleman et al., 1990].

Por otro lado, la aparición de infecciones disminuye drásticamente la incidencia de la enfermedad en las colonias de animales NOD. Por esta razón resulta fundamental controlar la entrada de agentes potencialmente patógenos en las instalaciones donde se mantienen estas colonias [Leiter, 1997]. No obstante, no se conoce ciertamente el mecanismo por el cual las infecciones pueden abortar el proceso autoinmunitario. En modelos experimentales, como en el caso de la disrupción del proceso autoinmunitario por el virus de la coriomeningitis (LCMV) en ratones NOD, se ha sugerido un mecanismo de apoptosis de las células autorreactivas por sobreestimulación [Oldstone, 1988; von Herrath et al., 2001].

## I. Introducción

Como se ha comentado anteriormente, la incidencia de la diabetes es considerablemente mayor en las hembras NOD que en los machos. Este hecho es consecuencia de la influencia de los niveles presentes de algunas hormonas, en este caso los estrógenos, sobre el desarrollo de la respuesta autoinmunitaria.

### 2.3.1.3. Cepas emparentadas con NOD resistentes a la T1D

La cepa **NOR** (Non-Obese Resistant) es también una cepa consanguínea, derivada del cruzamiento entre las cepas NOD y C57BL/KsJ. Dentro del genoma del modelo NOR, 14 cromosomas derivan enteramente de la cepa NOD, mientras que sólo 4 cromosomas contienen regiones que proceden de C57BL/KsJ (cromosomas 2, 4, 11 y 12). Aunque la cepa NOR comparte con NOD el haplotipo diabetogénico H-2g7, difiere de ésta en al menos 5 loci *Idd*, que le confieren resistencia a la enfermedad, de manera que no desarrolla insulinitis ni diabetes [Prochazka et al., 1992]. Estos animales, sin embargo, siguen siendo susceptibles al desarrollo de otras respuestas autoinmunitarias, ya que se encuentra infiltrado leucocitario en otros órganos con función exocrina, como es el caso de las glándulas salivares (sialitis).

La primera generación resultado del cruzamiento de la cepa NOD, susceptible a T1D, con la resistente NOR, denominada aquí **F1(NOD x NOR)**, se presenta mayoritariamente resistente al desarrollo de diabetes. Sin embargo, en todos los individuos se observa insulinitis de forma similar a la observada en los ratones NOD [Serreze et al., 1994]. Teniendo en cuenta que en este caso la insulinitis no suele desembocar en la destrucción masiva de las células beta pancreáticas, cabe asumir el carácter "no destructivo" o "benigno" de este infiltrado.

### 2.3.2. LA RATA BB

La rata BB (BioBreeding Diabetes-Prone Rat) fue originada en 1983 a partir de una colonia de ratas Wistar [Chappel and Chappel, 1983]. A diferencia de la cepa NOD, la incidencia de diabetes es similar en machos y hembras, pudiendo superar el 90% si los animales son estabulados en condiciones libres de patógenos. La diabetes en estos animales se presenta a partir de las 10-16 semanas de vida, pero la fase preclínica de insulinitis dura tan sólo dos semanas [Parish and Cooke, 1995].

En este modelo se han descrito 5 loci de susceptibilidad (*iddm*). Una vez más, la región génica correspondiente al MHC está estrechamente ligada con la susceptibilidad a la enfermedad (*iddm2*). Sin embargo, se ha descrito también que, en este modelo en particular, es indispensable la mutación *lyp* (*lymphoid protein tyrosine phosphatase*), descrita como *iddm1*, para el desarrollo de la diabetes. La cepa BB es homizigota para la mutación *lyp*, que origina una linfopenia caracterizada por una importante reducción en el número de linfocitos T en periferia, provocada por una elevada tasa de apoptosis de los linfocitos T maduros que salen del timo y de linfocitos T activados [Ramanathan and Poussier, 2001]. Aún así, en este



modelo, la diabetes también esta mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+; se postula que los pocos linfocitos T memoria circulantes sólo son rescatados de la apoptosis si son estimulados vía antígeno, lo cual induciría una hiperexpansión compensatoria. De esta manera es posible que el encuentro con autoantígenos diera lugar a una hiperproliferación de linfocitos T autorreactivos. Paralelamente otros defectos a nivel tímico, y de otras poblaciones celulares como células dendríticas, células T reguladoras y células NK, contribuyen también a la disfunción de los mecanismos de tolerancia en este modelo animal de T1D.

### 2.3.3. OTROS MODELOS DE T1D

La cepa de rata LETL (Long Evans Tokushima Lean) fue descrita en 1991, también como resultado de la selección de una línea de animales diabéticos. Al igual que la cepa BB, estos animales presentan diabetes de tipo 1, sin sesgo de género. Como en el resto de modelos animales, en este caso se presenta también un componente genético poligénico en el origen de la enfermedad, habiéndose descrito especialmente la contribución del haplotipo de MHC, que es el mismo que el de la rata BB. No obstante, a diferencia de la cepa BB, la rata LETL no presenta linfopenia [Eisenbarth, 2005].

Más recientemente, en 2001, se describió el modelo de rata LEW-1AR1/ZTM- idd. En este caso sólo un 20% de los animales presentan diabetes clínica, pero cabe destacar que, a diferencia de las otras cepas descritas anteriormente, los animales que no presentan diabetes tampoco desarrollan insulinitis [Eisenbarth, 2005]. Por otra parte, el infiltrado de los islotes en los animales diabéticos está predominantemente formado por células CD8+. En estos dos aspectos, el desarrollo de la enfermedad en este modelo se asemeja en mayor medida al que tiene lugar en humanos.

En conjunto, y aunque cada modelo experimental presenta características propias, la condición fundamental es que todos presentan diabetes de tipo 1, de forma espontánea, originada por un ataque autoinmunitario contra las células beta pancreáticas, y mediada por células T efectoras. Además, el origen de la enfermedad, en todos los modelos, es multifactorial y poligénico, presentándose siempre el locus de MHC ligado a la enfermedad [Leiter et al., 2004]. Todos los modelos presentan, además, otros defectos que afectan a los mecanismos de tolerancia central y/o periférica. Sin embargo, ningún modelo animal puede considerarse perfecto, y la patología de la enfermedad no es exactamente igual a la humana en ningún caso. En el ratón NOD, aún siendo el modelo más utilizado, el desarrollo de la patología presenta ciertas características que no se observan en humanos, como es la mayor incidencia en hembras, la insulinitis de grado moderado e incluso severo en los islotes, con predominio de linfocitos T CD4+, o la baja diversidad de anticuerpos antiislote detectables en suero [Roep et al., 2004]. Pero también la rata BB, cuya incidencia y características del infiltrado son más similares a las humanas, presenta otras diferencias, como la ausencia de reactividad humoral contra las

## I. Introducción

células beta [Leiter et al., 2004]. No obstante, estas diferencias no son suficientes para menospreciar la potencialidad de estos modelos animales como fuente de conocimiento respecto a la etiopatogenia de la T1D.

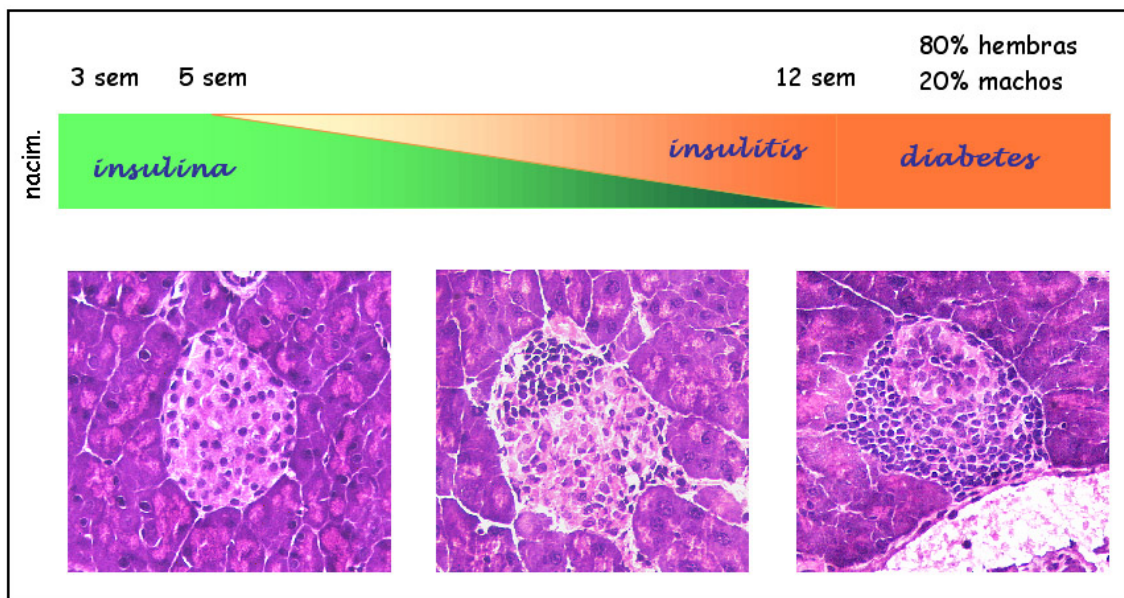
No hay que olvidar tampoco que estos modelos son cepas consanguíneas, es decir, que todos los individuos son genéticamente iguales. En la diabetes humana, en cambio, cada paciente presenta su propia combinación particular de defectos que conllevan al fallo de los mecanismos de tolerancia. De esta manera, a efectos teóricos, cada modelo animal puede considerarse como un único individuo, con lo cual la información que puede aportar es equivalente a la que podríamos obtener del estudio en profundidad de un paciente afectado de T1D. Por esta razón, el futuro de la investigación básica en T1D necesitará, con toda probabilidad, la diversificación de los estudios utilizando los diversos modelos animales de T1D, para obtener una información más completa.

### **2. 4. DESARROLLO DE LA T1D EN EL RATÓN NOD**

La diabetes tipo 1 en ratones NOD, así como se ha observado en humanos, presenta una fase inicial preclínica, en la que comienza la invasión de los islotes de Langerhans por parte de células del sistema inmunitario, mayoritariamente linfocitos. Durante esta fase de insulinitis, que se presenta a partir de las 3-5 semanas de vida, justo al final del periodo de lactancia de los animales, comienza también la destrucción progresiva de las células beta pancreáticas, mediada por linfocitos T, de manera que se ve disminuida la capacidad de producción de insulina (Figura 5).

A partir de las 12 semanas de vida, algunos animales pasan a presentar síntomas clínicos indicativos de diabetes (glucosúria e hiperglucemia), lo cual es reflejo de una pérdida de masa celular beta superior al 90%. Desde ese momento, se hace necesaria la administración diaria de insulina exógena para mantener unos niveles de glucemia compatibles con el bienestar del animal.

Si bien todos los ratones NOD presentan insulinitis, que avanza desde las primeras semanas de vida invadiendo los islotes pancreáticos, no todos ellos acaban presentando diabetes clínica. En un porcentaje de los animales, la destrucción de las células beta es limitada, de manera que, aunque la insulinitis se mantiene de forma crónica, persiste un remanente de células beta capaz de controlar la glucemia. El porcentaje de animales que acaban desarrollando diabetes depende en gran medida de las condiciones ambientales en las que se mantiene la colonia de ratones NOD, como se ha comentado anteriormente.



**Figura 5.** Evolución de la diabetes tipo 1 en ratones NOD. El infiltrado en los islotes pancreáticos aparece a las 3-5 semanas de edad. A partir de ese momento la insulinitis avanza, invadiendo progresivamente los islotes y destruyendo la masa celular beta. A partir de las doce semanas de edad, se empiezan a detectar casos de diabetes clínica, en aquellos animales cuyas células productoras de insulina han sido destruidas en más de un 90%.

El estudio de las diferentes etapas de la respuesta autoinmunitaria que se desarrolla en los ratones NOD, ha resultado en importantes avances en el conocimiento sobre la patogenia de la T1D. Así, se han descrito diversos defectos en el sistema inmunitario de estos ratones, que podrían afectar al correcto funcionamiento de los mecanismos de tolerancia, tanto central como periférica. En este modelo se han descrito deficiencias en el número y/o funcionalidad de las células presentadoras de antígeno, de las células NK T y células T CD4+CD25+ con función reguladora, e incluso de las propias células T, como se detalla más adelante [Delovitch et al., 1997]. Por otro lado, la aplicación de técnicas de transferencia de poblaciones celulares, así como de ingeniería genética (variantes transgénicas y animales knockout), ha ofrecido la posibilidad de realizar un análisis reduccionista de los mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad, analizando la contribución de cada elemento de forma individualizada.

#### 2.4.1. MECANISMOS EFECTORES: LINFOCITOS T

Los linfocitos T son los principales causantes directos de la destrucción de las células beta pancreáticas en la T1D. Los primeros estudios basados en la transferencia de esplenocitos de ratones NOD, revelaron que la inducción de la enfermedad en animales receptores requería la presencia tanto de linfocitos T CD4+ como de CD8+ [Bendelac, et al., 1987; Miller et al., 1988, Yagi et al., 1992; Christianson et al., 1993]. En contraposición, estudios posteriores realizados

## I. Introducción

con ratones NOD monoclonales, portadores de linfocitos T con una única especificidad (un único TCR, en ratones knockout para RAG2, y por tanto incapaces de reordenar TCRs o BCRs endógenos) han demostrado que tanto los linfocitos T CD4+ como CD8+ específicos contra antígenos de células beta son capaces de producir diabetes por sí mismos, en ausencia de otras especificidades de linfocitos T. Ante la contrariedad de los datos publicados, actualmente hay poco acuerdo sobre el papel específico desempeñado por los subtipos CD4+ y CD8+ en el desarrollo de la respuesta autoinmunitaria [Yang and Santamaria, 2004]. Algunos trabajos señalan un papel decisivo de los linfocitos T CD4+ en el desarrollo de la diabetes, lo cual queda patente por la estrecha asociación de la susceptibilidad a T1D con los alelos de MHC de clase II presentes en un individuo. Además, transferencias de clones autorreactivos de linfocitos T CD4+ aisladas de animales diabéticos, sin ayuda de otras poblaciones linfocitarias, han resultado en la transferencia de la enfermedad a los animales receptores [Christianson et al., 1993; Haskins et al., 1990; Bradley et al., 1992; Baker et al., 2002]. De hecho, se ha demostrado la capacidad citolítica de las células T CD4+ autorreactivas (en oposición a la función colaboradora tradicionalmente atribuida a este tipo celular), que de esta forma pueden atacar directamente a las células beta [Delovitch et al., 1997; Santamaria, 2001]. Por otro lado, también se ha atribuido un papel iniciador, por parte de los linfocitos T CD4+, en la aparición de la insulinitis, favoreciendo la atracción de células infiltrantes [Wang et al., 1996]. No obstante, los linfocitos T CD8+, clásicamente con función citolítica, son considerados los responsables del primer ataque contra las células beta pancreáticas, ya que la deficiencia de moléculas de MHC de clase I en las células beta pancreáticas en ratones con fondo genético NOD, bloquea la aparición de insulinitis. [Katz et al., 1993; Wicker et al., 1994; Serreze et al., 1994]. Aún así, algunos autores defienden que incluso este primer ataque es dependiente de la colaboración de las células CD4+ [Santamaria, 2001].

Una hipótesis razonable acerca de los mecanismos mediante los cuales se inicia el ataque autoinmunitario se resume a continuación [Kukreja et al., 1999]. Células APCs presentarían autoantígenos procedentes de células beta pancreáticas a células T CD4+ colaboradoras naive (que no han tenido contacto previo con el antígeno), en el contexto de moléculas de MHC de clase II, en presencia de moléculas coestimuladoras y citoquinas de tipo Th1. Tras una segunda señal por parte de linfocitos B, las células T CD4+ serían activadas, tomando un fenotipo Th1. Estas células T CD4+ podrían provocar la destrucción directa de las células beta pancreáticas, mediante apoptosis vía Fas, o bien mediar otros mecanismos de muerte celular, a través de la activación de células T CD8+ citotóxicas (con acción citolítica mediada por Fas, perforina, granzima, superóxidos) o de macrófagos (mediante la acción de radicales libres).

El análisis de los TCRs expresados por los linfocitos T infiltrantes, ha revelado que el repertorio clonal que presentan estas células es considerablemente restringido, especialmente en las primeras etapas de la insulinitis, tanto en el caso de los linfocitos T CD4+ como CD8+

[Santamaria et al., 1995; Verdaguer et al., 1996; Di Lorenzo et al., 1998; Baker et al., 2002]. Esto indica que, al inicio de la enfermedad, la respuesta T es restringida contra un reducido número de antígenos insulares, aunque más adelante, y posiblemente debido a la propia destrucción de las células beta por parte de los linfocitos T, se produce una expansión en la diversificación de los autoantígenos disponibles (proceso denominado *antigenic spreading*). Hasta el momento, no se han realizado estudios similares al respecto de los BCRs expresados por las células B infiltrantes.

#### 2.4.2. MECANISMOS REGULADORES

Como se ha comentado anteriormente, existen también diversas poblaciones de células T con funciones reguladoras, caracterizadas por diferentes fenotipos (CD4+CD25+, células NKT, células T DN, células T secretoras de citoquinas anti-inflamatorias). Estas poblaciones, en situaciones normales tienen un papel inhibitor de las respuestas autoinmunitarias. En el modelo NOD se han encontrado alteraciones que afectan a algunas de estas poblaciones. En este aspecto, por ejemplo, se ha descrito una disminución en la población de células T reguladoras CD4+CD25+ [Salomon et al., 2000] y NKT en los ratones NOD, así como una incapacidad de éstas últimas para secretar IL-4 [Gombert et al., 1996; Cardell, 2006], de esta manera, se podría estar favoreciendo la desviación de la respuesta autoinmunitaria hacia Th1 [Anderson and Bluestone, 2005].

Por otro lado, se ha descrito también la existencia, en estos animales, de un defecto en los linfocitos T, y sus precursores tímicos, que dificulta la apoptosis inducida por hiperactivación. De esta manera, el funcionamiento de los mecanismos de tolerancia se ve alterado, tanto a nivel de selección negativa en el timo, como posteriormente en periferia, facilitándose así la presencia y activación en periferia de linfocitos T autorreactivos [Kishimoto and Sprent, 2001].

En el modelo NOD también se ven afectados otros mecanismos de tolerancia central, ya que se ha descrito un defecto en la expresión del gen Aire en el timo de estos animales [Zuklys et al., 2000]. Como se ha comentado anteriormente, Aire es un factor de transcripción que controla la expresión ectópica de numerosos autoantígenos (especialmente aquellos cuya expresión está restringida a ciertos tejidos periféricos) en las células epiteliales tímicas, responsables de la presentación de antígenos propios a los timocitos durante los procesos de selección tímica [Liston et al., 2003]. Por otro lado, la propia naturaleza de la molécula de MHC de clase II presente en el modelo NOD (haplotipo I-Ag<sup>7</sup>), la cual se presenta indudablemente asociada a la susceptibilidad a la T1D (igual que en humanos), se ha sugerido que es intrínsecamente inestable, resultando así en una debilidad en la unión de los péptidos, lo cual podría dificultar el proceso de selección negativa frente a autoantígenos, a nivel tímico [Kanagawa et al., 1998; Tidgway et al, 1999].

## I. Introducción

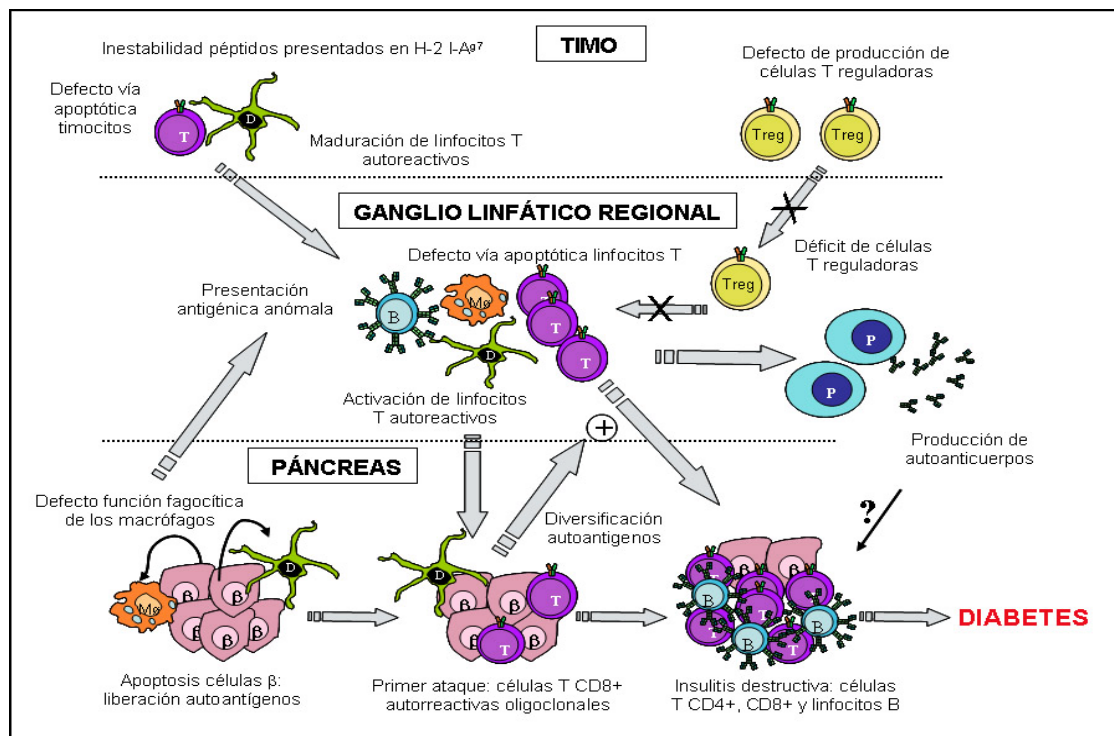
Algunos autores han descrito, recientemente, que los ratones NOD presentan un cierto grado de linfopenia, que se ve acusada con la edad de los ratones [King et al., 2004], aunque otros estudios no han observado este fenotipo. Esta peculiaridad, que hasta el momento se consideraba característica del modelo de rata BB exclusivamente, puede conllevar también la hiperexpansión de clones de linfocitos autorreactivos, ya sea por un efecto homeostático de los propios linfocitos, como por el déficit de regulación por parte de células T reguladoras, las cuales también se ven disminuidas por efecto de la misma linfopenia.

Sin duda alguna, este conjunto de defectos en el sistema inmunitario de los ratones NOD, en su contexto global, contribuye al fallo final de los mecanismos de tolerancia central y periférica. En consecuencia, la pérdida de la autotolerancia es el origen del desarrollo de diversos síndromes autoinmunitarios en estos animales (Fig. 6).

### 2.4.3. CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS

A pesar de que se ha demostrado ampliamente que las células T son las efectoras directas de la destrucción de las células beta pancreáticas, en el proceso de inicio de la respuesta autoinmunitaria es imprescindible la colaboración de otras células del sistema inmunitario en la presentación de autoantígenos específicos de células beta pancreáticas, a éstas células T autorreactivas [Yoon et al., 1998; Ludewig et al., 1998; Serreze et al., 1996; Behrens et al., 2004]. Las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B comparten la función común de capturar antígenos y presentar posteriormente péptidos derivados de éstos, en el contexto de moléculas de MHC de clase II, es decir, de actuar como células presentadoras de antígeno (APCs) para los linfocitos T. La presentación de antígenos a las células T puede desembocar en la activación de éstas, o en la inducción de tolerancia; esta dualidad funcional viene determinada por variables tales como la dosis de antígeno, el lugar y momento de presentación, la presencia de otras células auxiliares o citoquinas en el medio y, en especial, del estado de activación de la propia célula APC [Garza et al., 2000].

En una etapa previa al inicio de la insulinitis, se ha documentado la aparición de un proceso fisiológico de apoptosis (asociado a una reorganización y maduración tisular) a nivel de las células beta pancreáticas, con una tasa de muerte celular especialmente elevada en los ratones NOD de 2 semanas de edad, que podría dar lugar a la liberación de autoantígenos hasta el momento no disponibles en circulación [Mathis et al., 2001]. En este punto, resulta crucial la participación de los macrófagos, cuya función es la de fagocitar y eliminar rápidamente las células apoptóticas. No obstante, una vez más, se ha descrito una disfunción en el modelo NOD que afecta, en este caso, a la función fagocítica de los macrófagos [O'Brien et al., 2002; O'Brien et al., 2006] de manera que restos de células beta necrosadas pueden quedar expuestos para su presentación por parte de APCs, en unas condiciones favorables para la inflamación.



**Figura 6.** Factores implicados en la T1D: esquema de los defectos y alteraciones que contribuyen al inicio y posterior desarrollo de la diabetes de tipo 1, en el modelo de ratón NOD. Se postula que la inestabilidad de la presentación peptídica, mediada por moléculas de MHC del haplotipo I-Ag7, puede contribuir a un defecto en la selección negativa de los timocitos. Esta circunstancia, añadida al defecto en la vía apoptótica de los mismos, contribuye al incremento en periferia de linfocitos T maduros con capacidad autorreactiva. Por otro lado, estos defectos pueden afectar, de forma negativa, a la generación de células T con capacidad reguladora, también a nivel tímico. Por otra parte, a nivel pancreático, la apoptosis de las células beta, característica de la maduración fisiológica del páncreas endocrino alrededor de las 2 semanas de edad, puede contribuir, en el caso de estos animales, que presentan defectos en la función fagocítica de los macrófagos, a la implantación de un ambiente proinflamatorio en el cual se favorecería la captación de autoantígenos por parte de células dendríticas, en un estado activado. Así, estos autoantígenos podrían ser transportados y presentados a linfocitos T autorreactivos, a nivel de los ganglios pancreáticos. Anomalías en la presentación, en la vía apoptótica de los linfocitos T, y el déficit de células reguladoras pueden contribuir, en esta situación, a la activación final de los linfocitos T autorreactivos. Se hipotetiza que, en un principio, sólo unos pocos linfocitos T CD8+ serían activados de esta manera (probablemente mediante presentación cruzada de estos autoantígenos, en el contexto de moléculas de MHC de clase I, proceso denominado *cross-presentation*). Este primer ataque contra las células beta pancreáticas, contribuiría a la diversificación de autoantígenos insulares liberados y así, a su vez, a la amplificación de la respuesta autoinmunitaria, favoreciendo la activación y migración de linfocitos T CD4+ y CD8+ con capacidad citolítica, además de linfocitos B, a los islotes. En esta fase, la insulinitis puede quedar controlada (insulinitis benigna) o por el contrario invadir y destruir la masa celular beta, lo que desemboca, en última instancia en la aparición de diabetes. Se conoce que en los ganglios linfáticos pancreáticos también se activan linfocitos B, de los cuales derivan células plasmáticas que secretan autoanticuerpos, que son detectables en suero; sin embargo, se desconoce su función o posibles consecuencias.

T=célula T; Treg=célula T reguladora; B:linfocito B; MΦ=macrófago; D=célula dendrítica; β=célula beta; P=célula plasmática

## I. Introducción

Los estudios histopatológicos de páncreas, en la fase inicial de la insulinitis, han demostrado que las células dendríticas y los macrófagos son las primeras poblaciones celulares que migran a los islotes pancreáticos [Jansen et al., 1994; Rosmalen et al., 1997; Dahlén et al., 1998; Charré et al, 2002]. Asimismo, se ha demostrado que los antígenos liberados por las células beta pueden ser transportados por las células dendríticas a los ganglios linfáticos pancreáticos y, una vez allí, ser presentados a los linfocitos T [Green and Flavell, 1999; Höglund et al., 1999; Gagnerault et al, 2002]. Tras ser activados, estos primeros linfocitos T proliferarían y posteriormente migrarían también al páncreas, donde iniciarían el ataque autoinmunitario contra las células beta. Este proceso potenciaría la liberación de nuevos autoantígenos, que serían de nuevo captados y presentados a nivel de ganglios pancreáticos, amplificando así la respuesta autoinmunitaria (Figura 6).

Sin embargo, se ha descrito que las células dendríticas de ratones NOD sufren alteraciones en el proceso de maduración [Jansen et al., 1995]. Esto tiene consecuencias en cuanto a su capacidad para estimular la activación de los linfocitos T [Boudaly et al., 2002] debido, en parte, a deficiencias a nivel de moléculas coestimuladoras. De esta manera, se hace cuestionable el hecho de que las células dendríticas sean las únicas células presentadoras implicadas en el proceso diabetogénico. Por esta razón, y como se comenta más adelante, se ha incidido en los últimos años en el estudio de la posible importancia de los linfocitos B, como células presentadoras, en la activación de los linfocitos T autorreactivos, aportando los coestímulos necesarios para la activación de los mismos [Noorchashm et al., 2000].

En base a la importancia crucial que tienen los mecanismos de presentación antigénica, en la activación de las células T autorreactivas, se han generado numerosos modelos animales transgénicos y knockouts, así como terapias basadas en el bloqueo específico de alguna molécula mediante la administración de anticuerpos bloqueantes, con el objetivo de analizar en profundidad, y de forma individualizada, el papel de diversas moléculas implicadas en la coestimulación de los linfocitos T. Tal es el caso de CD40L [Green et al, 2000; Amrani et al, 2002], B7-1, B7-2, CD28 y CTLA-4 [Wong et al, 1998; Salomon et al, 2000; Lenschow et al., 1996]. En estos estudios, la interpretación de los resultados es a menudo complicada, ya que las mismas vías que intervienen en la activación de linfocitos T efectores son también esenciales en el desarrollo de las poblaciones de células T reguladoras [Salomon et al., 2000]. De la misma manera, se ha evaluado la influencia de diversas citoquinas con efecto potencial sobre el desarrollo de la respuesta autoinmunitaria, como las citoquinas proinflamatorias IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$ , o antiinflamatorias como IL-4, IL-13, IL-6, IL-10 o TGF $\beta$  [revisado en Meagher et al, 2003; Rabinovitch, 2003; Yang and Santamaria, 2003], así como sobre quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ ) [Cameron et al., 2000] y moléculas de adhesión (ICAM-1, L-selectina) [Bertry-Coussot et al., 2002]. Los resultados obtenidos en los diferentes estudios es, a menudo, contradictorio; en ocasiones el efecto observado en un animal deficiente para un



determinado elemento no es el contrario al observado cuando el elemento en cuestión es hiperexpresado. En estas circunstancias, es difícil extraer conclusiones definitivas, ya que además, a menudo, los mecanismos implicados en las respuestas autoinmunitarias son redundantes, de manera que el efecto de una deficiencia puede quedar enmascarado, a causa de un efecto compensatorio. Por último, cabe destacar que el diseño y análisis de estos modelos experimentales se ve dificultado, además, por el hecho de que aunque las citoquinas se clasifican en dos subgrupos mayoritarios, proinflamatorias y antiinflamatorias, el efecto final de éstas es a menudo dependiente de la localización anatómica donde son expresadas, el momento de aparición y la duración del estímulo [Yang and Santamaria, 2003].

#### 2.4.4. AUTOANTÍGENOS

Un punto clave en el entendimiento del ataque autoinmunitario que origina la diabetes tipo 1, es la identificación de los autoantígenos hacia los que éste va dirigido. En este sentido, la descripción, en los años 70, de la presencia de autoanticuerpos específicos contra elementos de los islotes pancreáticos, en el suero de pacientes diabéticos con componente autoinmunitario [Bottazzo et al., 1974], fue la primera evidencia de autorreactividad en esta enfermedad, y el primer paso en el camino hacia la identificación de los autoantígenos diana del ataque autoinmunitario. Desde ese momento, primero mediante la caracterización de estos autoanticuerpos circulantes, y más adelante a través del estudio de la reactividad de células T, se han identificado 25 autoantígenos, en humanos y en modelos animales, con mayor o menor representatividad y secuencialidad de aparición, a lo largo del curso de la enfermedad (Tablas 5 y 7) [Lieberman et al., 2003a].

En el ratón NOD, la detección de autoanticuerpos en suero ha sido también ampliamente evaluada. Así, en este modelo, igual que en humanos, se ha descrito que un elevado porcentaje de los individuos prediabéticos (prácticamente 50% en NOD) presentan anticuerpos antiinsulina [Yu et al., 2000]. En estos animales, también se ha descrito la aparición de autoanticuerpos contra carboxipeptidasa H, la proteína de choque térmico HSP-60 y periferina [Tisch et al., 1993]. Sin embargo, la presencia de anticuerpos circulantes específicos para GAD e IA-2 ha sido ampliamente discutida en estos animales, y actualmente se considera que, en el modelo NOD, no están demostradamente correlacionados con la aparición de la respuesta autoinmunitaria [Bonifacio et al., 2001].

## I. Introducción

**Tabla 7.** Listado de los autoantígenos para los se ha descrito respuesta humoral (autoanticuerpos en suero) y/o respuesta T en el modelo NOD. Están indicados con signo negativo aquellos antígenos para los que no se ha confirmado, hasta el momento, la presencia de autoanticuerpos en suero. Adaptado de Lieberman et al., 2003a.

ANTÍGENO	DISTRIBUCIÓN	AUTOANTICUERPOS	RESPUESTA CEL. T
Insulina	Células beta	+	CD4+ y CD8+
GAD65	Neuroendocrino	- <sup>1</sup>	CD4+ y CD8+
GAD67	Neuroendocrino	- <sup>1</sup>	CD4+
IA-2	Neuroendocrino	- <sup>1</sup>	CD4+
IA-2 $\beta$	Neuroendocrino	- <sup>1</sup>	CD4+
Carboxipeptidasa H	Neuroendocrino	+	CD4+
DMK	Ubícuo	-	CD8+
HIP/PAP (Reg family)	Páncreas	-	CD4+
HSP-60	Ubícuo (inducible)	+	CD4+
ICA69	Neuroendocrino	-	CD4+
IGRP	Islotes	-	CD8+
Periferina	Neuroendocrino	+	CD4+
S100 $\beta$	Neuroendocrino	-	CD4+

<sup>1</sup> Para los autoantígenos GAD65, GAD67, IA-2 e IA-2 $\beta$  diversos estudios habían descrito previamente la presencia de autoanticuerpos circulantes en ratones NOD (incluso desde las 4 semanas de vida, en el caso de GAD). No obstante, éstos datos no fueron validados por el estudio multicéntrico publicado en 2001 [Bonifacio et al, 2001], el cual sí confirmó la fiabilidad de la detección de anticuerpos antiinsulina en este modelo.

Aunque el estudio de la inmunidad humoral ha sido fundamental en el inicio del conocimiento de los autoantígenos relacionados con diabetes, cabe recordar que no se conoce con exactitud cuál es la función o efecto de los autoanticuerpos circulantes. Por otro lado, dado que se ha demostrado ampliamente que los linfocitos T son los efectores de la destrucción de las células beta pancreáticas, en esta patología, se han realizado también diversas aproximaciones experimentales dirigidas a la identificación de aquellos autoantígenos reconocidos por los linfocitos T diabetogénicos.

Puesto que se conoce que la susceptibilidad a la T1D está estrechamente ligada con el haplotipo de las moléculas de MHC de clase II, se han llevado a cabo numerosos estudios en la búsqueda de posibles autoantígenos capaces de estimular clones T CD4+ procedentes de ratones NOD. Estos estudios han aportado pruebas determinantes sobre la autorreactividad real y efectiva del sistema inmunitario sobre numerosos autoantígenos (Tabla 7). En el caso de la insulina [Alleve et al., 2001], GAD65 [Herman et al., 1999; Chao et al., 1999] y HSP-60 [Birk

et al., 1996; Abulafia-Lapid et al., 1999] cabe destacar la coincidencia en los epítomos reconocidos por los linfocitos T CD4+, en humanos y en el modelo murino NOD. Estos datos, concuerdan con el hecho de que los haplotipos de MHC de clase II que confieren susceptibilidad a la diabetes en humanos (HLA-DQ8) y en ratón (I-Ag7) son estructuralmente similares, lo cual remarca la influencia que tiene la capacidad de las moléculas de MHC para presentar un determinado repertorio peptídico, en la susceptibilidad individual a la T1D [Wucherpfenning, 2001b].

Un punto clave en la caracterización de autoantígenos en la T1D, es la diferenciación entre aquellos que son importantes en el inicio de la respuesta autoinmunitaria, y aquellos que sólo aparecen como consecuencia de la diversificación de la respuesta (*antigenic spreading*), tras la destrucción masiva de las propias células beta. Se ha descrito que la respuesta específica de linfocitos T CD4+ contra algunos antígenos como GAD65, GFAP y S100 $\beta$  es detectable en ratones NOD de tan sólo 3-4 semanas [Kaufman et al., 1993; Winer et al., 2003], lo cual sugiere que estos antígenos son relevantes en la respuesta autoinmunitaria inicial. En cambio la respuesta contra otros antígenos como la carboxipeptidasa H, periferina, I-A2 $\beta$  y HIP/PAP parece ser posterior (4-6 semanas) [Tisch et al., 1993; Achenbach et al., 2002; Gurr et al., 2002].

Es más reciente el estudio de clones T CD8+ diabetogénicos. En este caso se han caracterizado clones con una considerable representación en la insulinitis incipiente (ratones NOD de 4 semanas). Mediante esta técnica se ha confirmado que la insulina es una de las dianas inicial del ataque de células T CD8+ con potencial citotóxico [Wong et al., 1999]. Recientemente, la proteína IGRP (del inglés *islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*) y la DMK (del inglés *dystrophia myotonica kinase*), han sido identificadas también como antígenos clave en el inicio de la respuesta T citotóxica [Lieberman et al., 2003b; Lieberman et al., 2004]. La identificación de estos antígeno, los cuales no habían sido caracterizados previamente como dianas de la respuesta humoral, pone de manifiesto que es posible que aún queden otros autoantígenos relevantes por identificar.

Analizando los autoantígenos descritos hasta la fecha (Tabla 7), destaca el hecho de que la mayoría de ellos presentan una distribución de expresión no restringida a células beta. Insulina e IGRP son los únicos autoantígenos, descritos hasta ahora en NOD, cuya expresión es estrictamente restringida a islotes pancreáticos. Contrariamente, la mayoría de los autoantígenos son moléculas que se expresan en tejido neuronal, así como a nivel insular (8/12). Este hecho tiene una posible explicación en el origen común de ambos tejidos, ya que algunos autores mantienen la hipótesis de que las células endocrinas pancreáticas derivan del ectodermo embrionario, al igual que el sistema nervioso [Le Douarin 1988; Ecurat et al., 1991]. Estos datos presentan un especial interés, puesto que ponen en tela de juicio la

## I. Introducción

presunción de que el ataque autoinmunitario que se desarrolla durante la T1D se dirige únicamente contra las células beta pancreáticas [Winer et al., 2003].

La identificación de autoantígenos potencialmente iniciadores de la respuesta autoinmunitaria ha propiciado el diseño de diversos protocolos de inmunización, especialmente por vía oral o a través de otras mucosas, o acompañados de adyuvantes, con la intención de inducir tolerancia antígenoespecífica. De esta manera, mediante la administración de insulina, GAD o HSP-60, se ha demostrado la activación de poblaciones de células T reguladoras, capaces de inhibir el desarrollo de la respuesta autoinmunitaria, en el modelo NOD [Ablamunits et al., 1998; Alleva et al., 2002 Tisch et al., 1999]. Desafortunadamente, en la mayoría de los ensayos clínicos desarrollados hasta el momento, no se han confirmado los resultados obtenidos en los modelos animales [Roep et al., 2004]. No obstante, actualmente siguen en desarrollo diversos ensayos clínicos basados en la administración de péptidos derivados de estos autoantígenos, como es el caso del péptido p227 de la HSP-60 [Raz et al., 2001], cuyos resultados preliminares abren la esperanza de la posibilidad de la aplicación, en un futuro próximo, de vacunas antígenoespecíficas en el tratamiento preventivo de la T1D.

### 3. LOS LINFOCITOS B

Los linfocitos B son las células responsables de la producción de anticuerpos, pero también tienen un papel importante como células presentadoras. Dada la alta afinidad del reconocimiento antigénico por parte del BCR, los antígenos solubles pueden ser reconocidos e internalizados aún en muy bajas concentraciones. Por esta razón, ante antígenos poco abundantes, la presentación por parte de linfocitos B es más eficiente que mediante otras APCs, como las células dendríticas y los macrófagos.

Durante el desarrollo fetal, los linfocitos son generados en el hígado, pero tras el nacimiento esta función pasa a tener lugar a nivel de médula ósea [Rolink et al., 1993]. Así, en individuos adultos los linfocitos B se originan en la médula ósea, de donde salen en un estado inmaduro transicional, para culminar su maduración en el bazo [Chung et al., 2003]. Las células B maduras recirculan por los diferentes órganos linfoides secundarios, donde pueden ser estimuladas si se encuentran con el antígeno. La unión específica del receptor del linfocito B con el antígeno desencadena una serie de eventos dirigidos a la diferenciación de células productoras de anticuerpos y células B memoria, encargadas de acelerar la respuesta inmunitaria específica en posteriores encuentros con el antígeno.

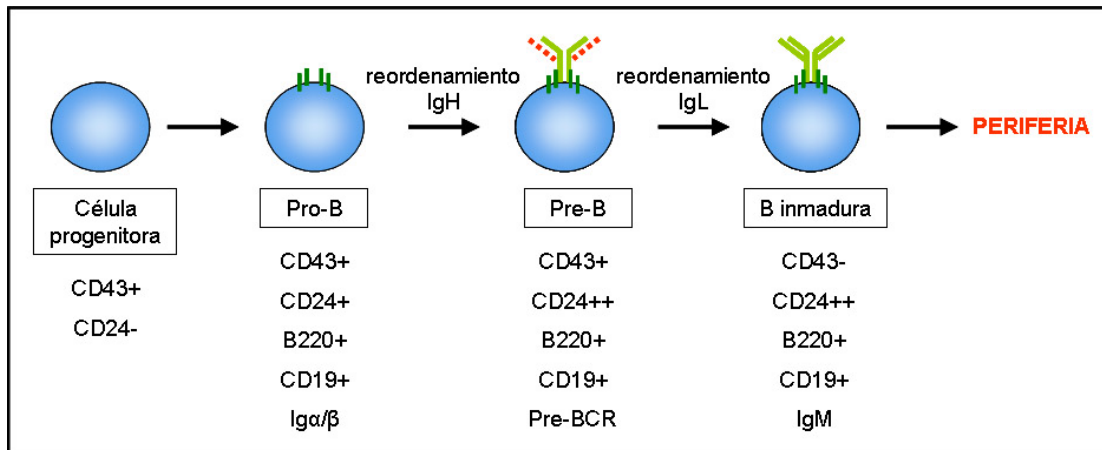
A continuación se profundiza en los procesos de generación y activación de las diferentes poblaciones de linfocitos B en ratón, puesto que los modelos murinos son la base del estudio descrito en esta memoria.

#### 3.1. MADURACIÓN Y ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS B

##### 3.1.1. GENERACIÓN Y MADURACIÓN DE LOS LINFOCITOS B

Los linfocitos B derivan de progenitores hematopoyéticos que se diferencian en la médula ósea (Fig. 7) [Hardy et al., 2001]. El primer paso hacia la diferenciación a linfocitos B, se caracteriza por la expresión de moléculas específicas de linaje como CD45R/B220 [Li et al., 1996; Allman et al., 1999], seguida de CD19, en lo que se denomina células pro-B [Hardy et al., 1991; Osmond et al., 1998]. A continuación se reordenan los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. En esta fase de célula pre-B, la cadena pesada se expresa en la superficie de las células formando complejos con cadenas ligeras sustitutivas invariantes [Karasuyama et al., 1996]. En el siguiente paso, tras el reordenamiento de los genes de la cadena ligera de la inmunoglobulina, se generan linfocitos B inmaduros, caracterizados por la expresión en membrana del receptor completo, con isotipo IgM. En el siguiente paso, a células B transicionales T1, se pierde la dependencia de factores estromales como IL-7 para la supervivencia de los linfocitos B, lo cual permite su liberación al torrente circulatorio [Jacobsen et al., 1990; Hardy et al., 1991].

## I. Introducción

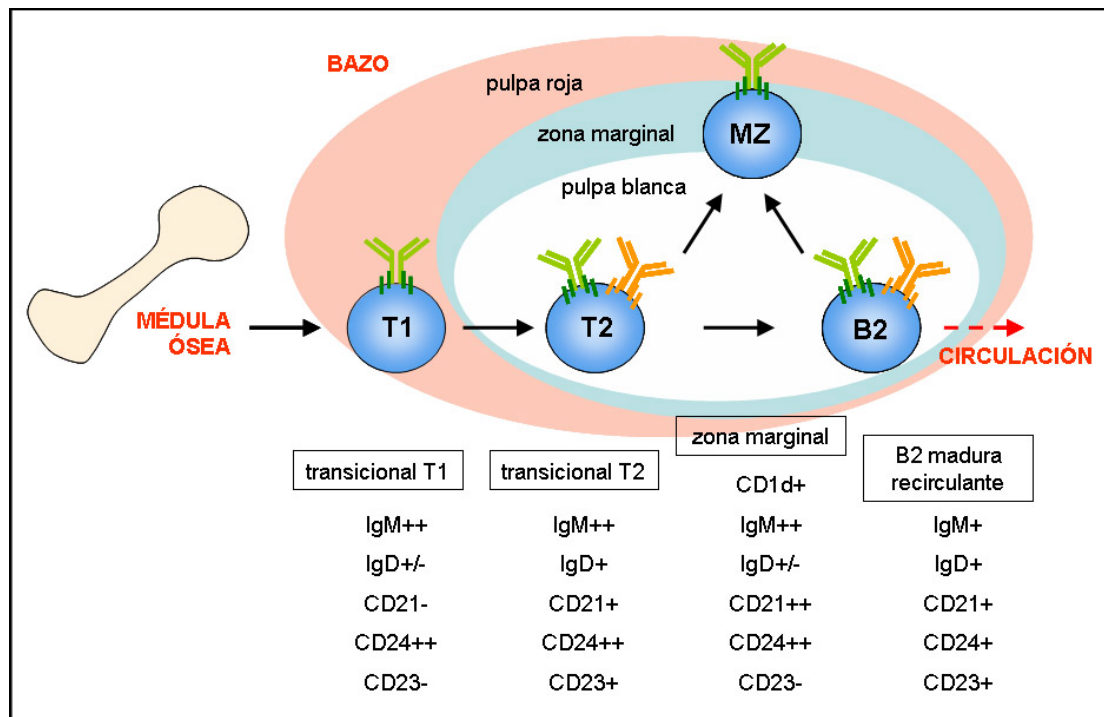


**Figura 7.** Estadios de la maduración de los linfocitos B en médula ósea. En médula ósea las células progenitoras dan lugar a células pro-B, el primer estadio que presenta marcadores propios del linaje de linfocitos B (CD19 y B220). El paso a células pre-B se acompaña de la expresión del receptor pre-BCR compuesto por las cadenas pesadas reordenadas y unas cadenas ligeras sustitutivas invariantes. Posteriormente, el BCR completo, con todas las cadenas reordenadas, se expresa en las células B inmaduras. Cuando estas células pierden la dependencia de factores estromales de la médula ósea (estadio transicional) salen al torrente circulatorio.

Las células B transicionales que salen de médula ósea son conducidas hacia el bazo por la circulación sanguínea. Allí tiene lugar la conversión final a linfocitos B maduros (Fig. 8) [Carsetti, 2000]. Las células transicionales de tipo 1 (T1), recién emigrantes de la médula ósea, llegan a la pulpa roja del bazo expresando únicamente el isotipo IgM. En su migración posterior a los folículos linfoides adquieren la expresión de IgD, CD21 y CD23, lo cual las define como transicionales de tipo 2 (T2) [Carsetti et al., 1995; Loder et al., 1999]. La maduración final de estas células se caracteriza por una reducción en la expresión de IgM y CD24. Las células maduras adquieren también la capacidad de migrar preferencialmente a los nódulos linfáticos, mediante la expresión del receptor de L-selectina (CD62L), lo cual les permite comenzar los ciclos de recircularización periférica, en busca de la interacción con el antígeno [Cyster, 2003; Miosge et al., 2005].

### 3.1.2. SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B

La población convencional de linfocitos B se denomina también B-2. Existen también otras subpoblaciones de linfocitos B, no tan abundantes en circulación, que presentan peculiaridades fenotípicas y funcionales.



**Figura 8.** Estadios finales de maduración de los linfocitos B en el bazo. Las células transicionales de tipo 1 (T1) emigran de médula ósea y llegan a la pulpa roja del bazo. La migración hacia la pulpa blanca esplénica va acompañada de la derivación a células transicionales de tipo 2 (T2). En la pulpa blanca las T2 dan lugar a células B maduras recirculantes (B-2), con capacidad para migrar preferentemente a nódulos linfáticos. En la zona marginal (MZ) en la zona limítrofe entre la pulpa roja y la pulpa blanca, residen los denominados linfocitos B de zona marginal, que pueden derivar de linfocitos B transicionales T2, así como de linfocitos B maduros residentes en los folículos linfoides.

### 3.1.2.1. Linfocitos B-1

Los linfocitos B-1, se encuentran predominantemente en la cavidades peritoneal y pleural, mientras que son minoritarias en los órganos linfoides secundarios y en circulación [Hayakawa et al., 1983]. Estos linfocitos B-1 presentan un fenotipo  $B220^{low}$   $IgM^{high}$   $IgD^{-}$   $CD21^{-}$   $CD19^{+}$   $CD23^{-}$   $CD11b^{+}$ . Además es posible diferenciar entre la subpoblación B-1a, que presenta expresión de CD5, mientras que la subpoblación B-1b carece de este marcador [Berland et al., 2002]. Estas células se originan en el hígado fetal y, durante la vida adulta, esta población se mantiene gracias a su capacidad de autorrenovación [Hayakawa et al., 1986]. Sin embargo, aún existe controversia sobre el parentesco de linaje entre la población de linfocitos B-1 y los convencionales B-2 [Herzenberg, 2000]. La población de linfocitos B-1 presenta un repertorio de inmunoglobulinas restringido, lo cual les confiere una menor diversidad en la unión del BCR

## I. Introducción

a posibles antígenos. Estas células secretan espontáneamente anticuerpos naturales, que no presentan signos de maduración de la afinidad [Martin et al., 2000]. Estos anticuerpos son principalmente del isotipo IgM, y a menudo reaccionan con polisacáridos microbianos, aunque también con algunos autoantígenos, con cierta frecuencia. Se considera que estas células son las principales efectoras de las respuestas humorales contra antígenos T-independientes de origen microbiano [Hayakawa et al., 2000; Martin et al., 2001].

### 3.1.2.2. Linfocitos B de zona marginal (MZ)

En la zona marginal de la pulpa blanca esplénica, se localiza otra subpoblación de linfocitos B también especializada en la producción de anticuerpos naturales [Martin et al., 2001]. Estos linfocitos de la zona marginal (MZ, del inglés *marginal zone*) se encuentran en contacto directo con macrófagos especializados en la captura de bacterias y otros antígenos particulados, procedentes de la circulación sanguínea que fluye por el seno marginal [Carsetti et al., 2004]. Estos macrófagos pueden estimular a los linfocitos B de zona marginal, promoviendo su derivación a células productoras de anticuerpos naturales o a células con función presentadora. Estas últimas tienen la capacidad de migrar a la pulpa blanca, y allí activar a células T CD4+ [Mebius et al., 2005].

Así, los linfocitos de zona marginal comparten con los B-1 su función de primera línea de defensa de la respuesta adaptativa frente a antígenos T-independientes, transportados por la circulación sanguínea (MZ) o procedentes del tracto gastrointestinal (B-1).

Se considera que los linfocitos B de zona marginal ( $IgM^{hi}$   $IgD^{low}$   $B220^{low}$   $CD21^{hi}$   $CD1d^{+}$   $CD9^{+}$ ) [Martin et al., 2002] derivan de los linfocitos B transicionales T2 [Loder et al., 1999]. Se ha propuesto un modelo según el cual la intensidad de la señal recibida a través del BCR podría ser un factor decisivo en la diferenciación final de los linfocitos B [Pillai et al., 2005]. Así, señales relativamente intensas derivarían hacia un fenotipo de linfocitos B maduros de tipo B-2 (folicular), mientras que señales débiles inducirían la diferenciación a células B de zona marginal. No obstante, también parece probable que incluso las células B maduras (B-2) puedan derivar a linfocitos B de zona marginal (Fig. 8).

### 3.1.3. ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS B

Los antígenos denominados T-independientes, como los polisacáridos y los lípidos, presentan múltiples epítomos antigénicos equivalentes, lo cual facilita el entrecruzamiento de los BCRs en la membrana de los linfocitos B. En esta situación, los linfocitos B son activados directamente sin necesidad de la colaboración de linfocitos T. La respuesta humoral derivada de estas interacciones está compuesta principalmente por anticuerpos de isotipo IgM de escasa afinidad, y no se observa una capacidad de memoria importante [Mond et al., 1995].



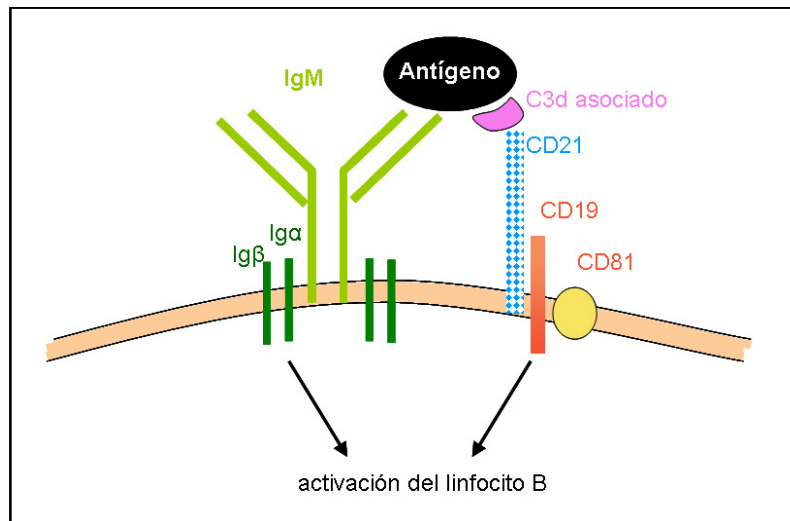
Los antígenos T-dependientes, principalmente de origen proteico, no pueden activar, por sí mismos, la respuesta humoral. En estos casos, como su nombre indica, la diferenciación final a células productoras de anticuerpos y a células memoria depende de la interacción con linfocitos T CD4+ colaboradores, específicos para el mismo antígeno [Parker, 1993]. La respuesta humoral frente a este tipo de antígenos se caracteriza por la producción de anticuerpos de alta afinidad, con diferentes isotipos, y una mayor capacidad de memoria. Las fases necesarias en la activación de este tipo de respuestas se describen a continuación [Lanzavecchia A, 1985].

#### 3.1.3.1. Estimulación antigénica (*priming*)

El encuentro entre los linfocitos B naive (que no han tenido contacto previo con el antígeno) y los antígenos suele tener lugar en los folículos primarios, donde confluyen los linfocitos B recirculantes y los antígenos que se encuentran en la circulación sanguínea (bazo) o provienen de tejido por la vía linfática (ganglios linfáticos).

Los antígenos son reconocidos por el receptor de antígeno de los linfocitos B (BCR) de forma específica. La inmunoglobulina de membrana consta de dos cadenas pesadas y dos ligeras, pero ninguna de ellas tiene una región intracitoplasmática con capacidad de unión a proteínas intracelulares. Dentro del complejo del BCR, junto a la inmunoglobulina de membrana, se incluye también el heterodímero Ig $\alpha$ /Ig $\beta$  [Kurosaki, 1998], responsable de la señalización intracelular a través de los motivos ITAM (del inglés, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) ricos en tirosinas [Reth, 1989]. Además, la activación del linfocito B se ve favorecida por segundas señales que le son proporcionadas por el complejo correceptor, formado por las moléculas CD21, CD19 y CD81 (Fig.9). CD21 se une a la proteína C3d de la vía del complemento, mientras que CD19 es responsable de la señalización intracelular. De esta manera, la activación del linfocito B se ve potenciada si C3d se encuentra unido al antígeno reconocido por el BCR [Fearon et al., 2000]. Se ha demostrado que la regulación de la señalización vía BCR ejercida por CD19 es, además, un elemento clave en el desarrollo de las diferentes subpoblaciones de células B (B-1, B-2 y de zona marginal) [Engel et al., 1995; Rickert et al., 1995].

La unión del antígeno a los receptores de membrana, además de iniciar la activación de los linfocitos B, favorece la internalización de los complejos antígeno-BCR en vesículas endosómicas, las cuales son dirigidas a las rutas de procesamiento antigénico. De esta manera, los péptidos derivados del antígeno captado llegan a ser presentados unidos a moléculas del MHC de clase II [Batista et al., 2001]. El fenotipo de estos linfocitos estimulados se caracteriza por la hiperexpresión en membrana de moléculas del MHC de clase II, así como de moléculas con función coestimuladora como CD80 y CD86. En estos linfocitos B estimulados se observa también un incremento en la expresión de receptores de citoquinas.

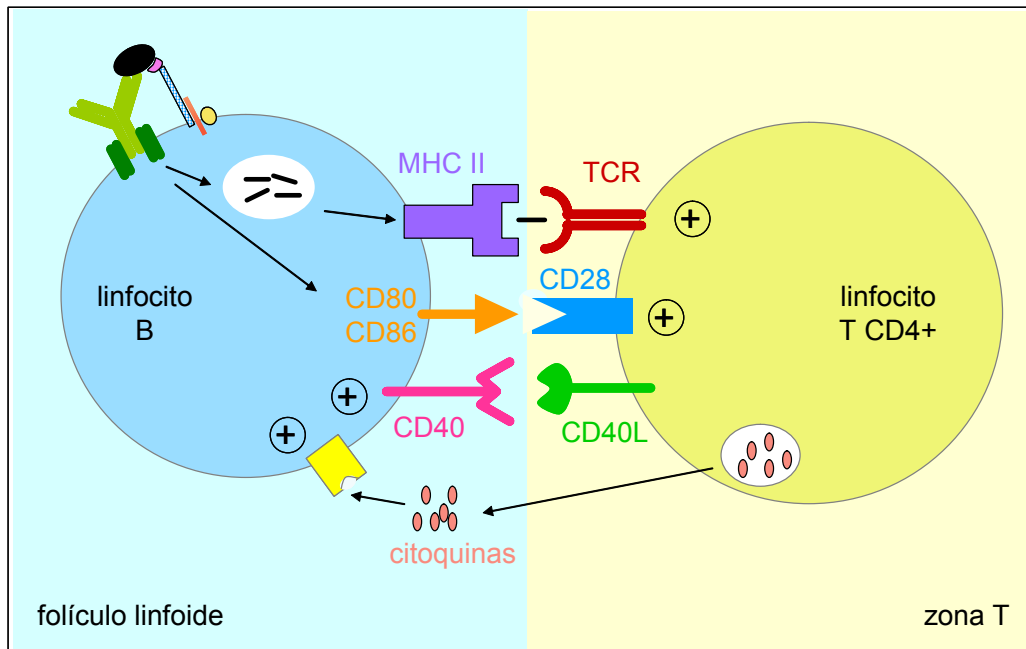


**Figura 9.** Complejo y correceptores del receptor de antígeno en los linfocitos B. Las cadenas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  forman parte del complejo del BCR. Las moléculas CD21, CD19 y CD81 forman parte del complejo correceptor, que potencia la señal activadora del BCR cuando la proteína C3d del complemento se encuentra unida al antígeno (principalmente antígenos de origen microbiano). Las moléculas Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  son las responsables de iniciar la cascada de señalización que media la activación de los linfocitos B, mientras que CD19 potencia esta vía de señalización, y estimula el procesamiento y la presentación antigénica.

### 3.1.3.2. Interacción antígeno-específica con linfocitos T CD4+

Los folículos linfoides están compuestos principalmente por linfocitos B, mientras que los linfocitos T se localizan en la zona que rodea los folículos, también denominada zona T. Por ello, los linfocitos B estimulados que requieren la colaboración de los linfocitos T CD4+ colaboradores migran al borde del folículo [Toellner et al., 1996]. Si un linfocito T CD4+ específico para el mismo antígeno ha sido estimulado mediante la presentación del antígeno por parte de una célula APC, también habrá migrado a la zona del borde del folículo y allí podrá tener lugar la interacción antígeno-específica entre la célula T y B (aunque el determinante antigénico reconocido por ambas células puede ser distinto) (Fig. 10) [McHeyzer-Williams et al., 2005]. Los linfocitos B estimulados, cuya capacidad presentadora y coestimuladora ha sido potenciada, pueden activar a los linfocitos T a través del TCR y de CD28, que se une a las moléculas coestimuladoras. A su vez, los linfocitos T activados aumentan la expresión de CD40L y de citoquinas del tipo IL-2, IL-4 e IL-6 [Clark et al., 1994]. Estos factores inducen la activación completa de los linfocitos B, los cuales se especializan en

la producción de anticuerpos o migran de nuevo a los folículos linfoides para formar un centro germinal [Bishop et al., 2001].



**Figura 10.** Interacciones moleculares bidireccionales entre los linfocitos B y T estimulados (*primed*) vía antígeno, en el borde del folículo linfoide. El antígeno captado por los linfocitos B, mediante la internalización del BCR, es presentado a los linfocitos T en forma de péptidos unidos a moléculas del MHC de clase II. La unión del TCR y la interacción con moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) inducen la activación de los linfocitos T CD4+. Estos linfocitos colaboradores aumentan la expresión de CD40L y la producción de citoquinas, que inducirán la activación completa de los linfocitos B.

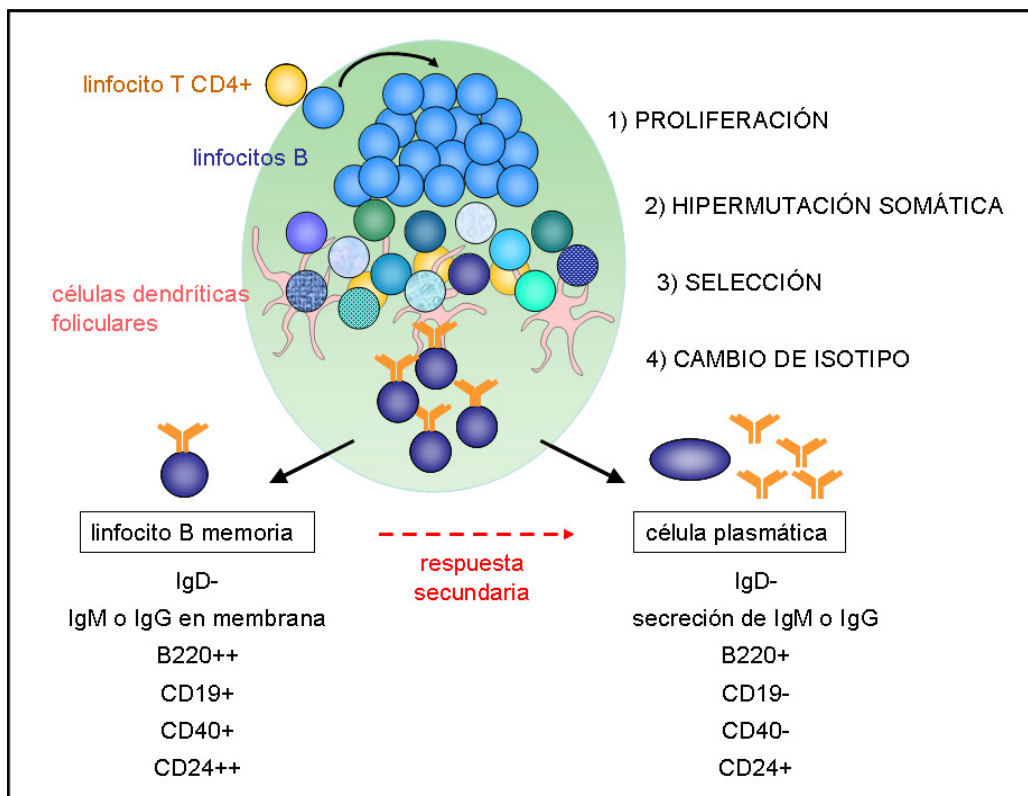
### 3.1.3.3. Diferenciación a células plasmáticas

Algunos de los linfocitos B activados de esta manera son diferenciados directamente a plasmablastos. La activación vía CD40 induce el cambio de isotipo [Armitage, 1992; Quezada et al., 2004], pero éste viene determinado por las citoquinas que hayan sido producidas por los linfocitos T colaboradores. Tras la expansión clonal de los plasmablastos, éstos derivan a células plasmáticas que quedan residentes en las zonas extrafoliculares, o en la pulpa roja en el caso del bazo, donde los anticuerpos producidos son liberados rápidamente al torrente circulatorio [Ho et al., 1986; Jacob et al., 1991].

## I. Introducción

### 3.1.3.4. Formación del centro germinal: maduración de la afinidad y producción de células memoria

Otros linfocitos B, en cambio, tras ser activados vuelven al folículo linfoide para formar un centro germinal. Allí los linfocitos B comienzan la expansión clonal y tienen lugar fenómenos de hipermutación somática en las regiones variables de las inmunoglobulinas (Fig.11) [McHeyzer-Williams et al., 2001; Wolniak et al., 2004].



**Figura 11.** Diagrama esquemático de los procesos que tienen lugar durante la reacción de centro germinal. Algunos linfocitos B, tras ser activados por las células T colaboradoras en el borde del folículo linfoide, migran de nuevo al interior del folículo y proliferan, formando una zona oscura, con una elevada densidad celular. En estas células se producen hipermutaciones en las regiones variables de las inmunoglobulinas. Tras la migración de los linfocitos a la zona clara del centro germinal, donde se encuentran células dendríticas foliculares y linfocitos T foliculares, se produce una selección de aquellos linfocitos B cuyo BCR ha adquirido mejor afinidad. Tras el cambio de isotipo, los linfocitos se diferencian a células memoria o a células productoras de anticuerpos.

Dentro del microambiente del centro germinal existen tipos celulares especializados, como las células dendríticas foliculares y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> foliculares, ambos fundamentales en el proceso de selección de aquellos linfocitos B cuyo BCR ha mejorado la afinidad [Tew et al., 1990, MacLennan, 1994; Kosco-Vilbois, 2003]. Tras este proceso de maduración de la afinidad por el antígeno [Rajewsky et al., 1996], se originan linfocitos B memoria y células plasmáticas con diferentes isotipos. Los linfocitos B memoria tienen una larga supervivencia, y quedan residentes en ganglios linfáticos u otros tejidos linfoides, mientras que las células plasmáticas migran preferentemente a médula ósea, donde seguirán produciendo anticuerpos de manera continuada [Minges Wols et al., 2002].

Ante posteriores contactos con el mismo antígeno, los anticuerpos producidos de forma continua por las células plasmáticas en médula ósea pueden neutralizar directamente el patógeno u opsonizarlo, de manera que se facilita la presentación a células B memoria [McHeyzer-Williams et al., 2005]. Los linfocitos B memoria activados en esta respuesta secundaria originan la proliferación rápida de clones de linfocitos B de alta afinidad, que desarrollarán funciones de presentación y formarán nuevas células plasmáticas. Así, mientras que la respuesta primaria, resultado de la activación de los linfocitos B naive, tarda entre 5 y 10 días, la respuesta secundaria se desarrolla en sólo 1-3 días.

## **3.2. PAPEL DE LOS LINFOCITOS B EN LA DIABETES TIPO 1**

### **3.2.1. Producción de autoanticuerpos**

A pesar de que los linfocitos B también tienen capacidad presentadora de antígenos, durante muchos años han sido considerados, en el desarrollo de la diabetes autoinmunitaria, principalmente por su capacidad secretora de autoanticuerpos contra antígenos de células beta, los cuales pueden ser detectados en el suero de los individuos diabéticos y también prediabéticos. Independiente de su aplicación diagnóstica, no se conoce con certeza la función o consecuencias que se derivan de la producción de estos autoanticuerpos, en el transcurso de la respuesta autoinmunitaria. Aunque, mediante la eliminación de la capacidad secretora de anticuerpos, en un modelo transgénico, se ha podido comprobar que esta función no es imprescindible para que los linfocitos B promuevan el desarrollo de la diabetes [Wong et al., 2004], otros estudios han demostrado que la transmisión transplacentaria de autoanticuerpos maternos dirigidos contra antígenos insulares (correspondientes a isotipos IgG) en los animales NOD es clave en la posterior aparición de diabetes en la progenie [Greeley et al., 2002; Lemke et al., 2004]. Se ha postulado que estos autoanticuerpos podrían inducir, tras la unión al antígeno, la captura del inmunocomplejo mediante receptores de Fc (que reconocen la región constante de las inmunoglobulinas), presentes en la superficie de células dendríticas, favoreciendo de este modo la posterior presentación del antígeno en cuestión a células T

## I. Introducción

autorreactivas [Wong and Wen, 2005]. Alternativamente, hay otros posibles mecanismos mediante los cuales la respuesta autoinmunitaria podría verse potenciada, por efecto de los autoanticuerpos específicos de célula beta; entre éstos se incluyen el daño directo a la propia célula diana, o citotoxicidad indirecta mediante opsonización. No obstante, no existen evidencias de que se produzcan estos mecanismos, en el modelo NOD o en humanos, siendo además poco probables, puesto que los autoantígenos contra los que van dirigidos estos anticuerpos son de localización típicamente intracelular.

### 3.2.2. Presentación de antígenos y activación de la respuesta T

Por otro lado, la inmunoglobulina expresada en la superficie de los linfocitos B los convierte, gracias a la elevada afinidad del reconocimiento específico antígeno-anticuerpo, en una célula presentadora altamente eficaz, capaz de capturar y presentar antígeno incluso cuando éste es poco abundante. Por esta razón, numerosos estudios realizados en los últimos años han indagado en la posible función determinante de los linfocitos B en la presentación y/o regulación de los linfocitos T efectoras de la respuesta autoinmunitaria dirigida contra las células beta. Por un lado, algunos estudios apoyan la hipótesis según la cual los linfocitos B tendrían un papel activador en el desarrollo de la patología autoinmunitaria, presentando autoantígenos insulares a linfocitos T autorreactivos, promoviendo así su activación. Por el contrario, otros trabajos sugieren un posible papel inhibidor de la respuesta autoinmunitaria, por parte de los linfocitos B.

Durante la activación de los linfocitos T, las células dendríticas suelen ser las responsables de la presentación inicial del antígeno (proceso denominado *priming*). No obstante, se postula que una segunda coestimulación, por parte de linfocitos B estimulados específicos para el mismo antígeno (como se ha descrito anteriormente que sucede en el borde de los folículos linfoides) potencia en gran medida la activación de estas células T [Bretscher et al., 1999; Kleindienst et al., 2005]. En el caso del modelo NOD, la participación de los linfocitos B en la presentación de antígenos a los linfocitos T parece ser aún más decisiva, ya que se ha descrito que en este modelo existe una disfunción en las capacidades coestimuladoras de las células dendríticas y macrófagos [Noorchashm et al., 2000]. En este sentido, diversos grupos han estudiado diferentes modelos derivados del ratón NOD con deficiencias a nivel de linfocitos B, y en todos ellos se ha observado, en mayor o menor grado, una reducción en la respuesta autoinmunitaria. La administración de anticuerpo anti- $\mu$  en animales NOD, para deplecionar los linfocitos B "in vivo", resulta en una incapacidad total para desarrollar diabetes, e incluso insulinitis [Noorchashm et al., 1997]. Esta observación sugiere que los linfocitos B podrían tener un papel imprescindible ya al inicio de la insulinitis, posiblemente mediando la presentación inicial del antígeno a los linfocitos T [Serreze et al., 1996; Serreze et al., 1998]. El modelo de ratón NOD. $\mu$ MT (el cual presenta una disrupción en el exón de membrana de la cadena  $\mu$  del gen de la inmunoglobulina, imprescindible para la maduración de los linfocitos B), así como el

modelo knock-out para B220, ambos carentes de células B, presentan una insulinitis leve de carácter "benigno" que, en la mayoría de los casos, no acaba derivando en el desarrollo de diabetes [Akashi et al, 1997; Greeley et al, 2001; Chiu et al, 2001]. Se observa el mismo resultado en el modelo de ratón NOD con deficiencia de I-A<sup>g7</sup> (moléculas MHC de clase II) restringida a linfocitos B [Noorchashm et al., 1999a], demostrándose así la importancia de su función presentadora. Contrariamente, se ha descrito el caso de un paciente que, pese a presentar inmunodeficiencia de células B (agammaglobulinemia ligada al cromosoma X), había desarrollado diabetes autoinmunitaria [Martin et al., 2001], lo cual sugiere que los linfocitos B no son imprescindibles en el desarrollo de la enfermedad. En conjunto, estos resultados indican que los linfocitos B podrían no ser los responsables de la primera presentación del autoantígeno insular a las células T autorreactivas. No obstante, sí que tendrían un papel fundamental en la activación de la función efectora por parte de éstas y su posterior migración y proliferación dentro del islote. De hecho, estudios recientes demuestran que los linfocitos B son cruciales en la diversificación antigénica de la respuesta T frente a diversos autoantígenos de células beta, que se observa durante el desarrollo de la T1D [Dai et al., 2005; Tian et al., 2006]. En cualquier caso, se ha demostrado que esta función de amplificación de la respuesta autoinmunitaria viene determinada por la especificidad antigénica presentada por los linfocitos B de un individuo, ya que se ha comprobado que el aumento, promovido a través de manipulación genética del BCR, de la frecuencia de células B autorreactivas contra antígenos de islote, provoca un aumento significativo en la incidencia de la diabetes [Hulbert et al., 2001; Silveira et al., 2002]. De la misma manera, se ha demostrado también un papel determinante de los linfocitos B como presentadores de antígeno, en otras patologías con origen autoinmunitario como es el caso de la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico [Takemura et al., 2001; Martin and Chan, 2004].

### 3.2.3. Actividad reguladora

Contrariamente, los linfocitos B también podrían tener un papel inhibitor sobre la respuesta autoinmunitaria. De hecho, se conoce que los linfocitos B pueden tener una acción inhibitora directa sobre la activación de los linfocitos T, cuando no presentan moléculas coestimuladoras [Porakishvili et al., 2001]. Algunos trabajos sugieren que en cepas de ratones resistentes a T1D, los linfocitos B podrían actuar controlando la respuesta destructiva de los linfocitos T autorreactivos. Así, se ha observado que en ratones NOR (resistentes) portadores transgénicamente de un TCR procedente de un clon altamente diabetogénico, la presencia de linfocitos endógenos es suficiente para prevenir la enfermedad, aunque se presenta insulinitis; por el contrario, la ausencia de linfocitos endógenos (NOD.Rag2<sup>-/-</sup> portadores del transgén TCR altamente diabetogénico) desemboca en el desarrollo de una diabetes fulminante, debido a un incremento en la desregulación de los linfocitos T autorreactivos [Verdaguer et al, 1999]. Por otro lado, ensayos de transferencia "in vivo" de células B esplénicas estimuladas "in vitro"

## I. Introducción

con LPS, han demostrado que éstas pueden estimular la apoptosis linfocitaria, previniendo así la aparición de T1D en los animales NOD [Tian et al, 2001]. Existen también otros mecanismos por los que los linfocitos B pueden regular la respuesta efectora; en el modelo NOD se ha descrito que las células B pueden activar a las células reguladoras NKT para secretar IL-4 [Bezbradica et al., 2005]. Incluso, en otras enfermedades de origen autoinmunitario, se ha descrito que la respuesta efectora y/o inflamatoria puede ser regulada por células B productoras de IL-10, tanto en modelos murinos de esclerosis múltiple (encefalomielitis autoinmunitaria experimental) como de inflamación intestinal crónica [Fillatreau et al, 2002; Mizoguchi et al, 2002; Mauri et al., 2003].

Todos estos datos, aún presentar una aparente contradicción, pueden ser indicativos de estados funcionales determinantes de diferentes actividades (activadora versus tolerogénica) en los linfocitos B, según la fase de desarrollo de la enfermedad, o en distintas localizaciones anatómicas.

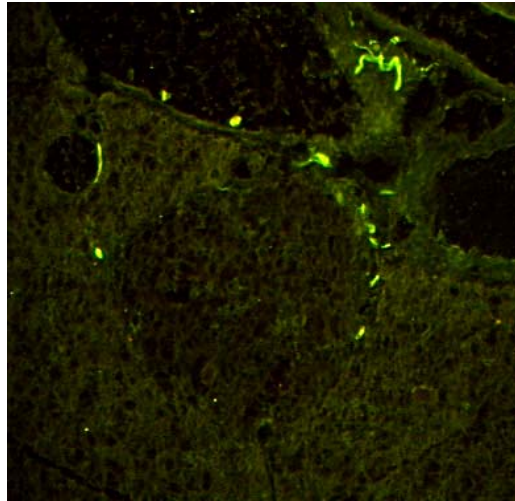
### **3.3. LOS LINFOCITOS B INFILTRANTES EN ISLOTES: ANTECEDENTES DEL ESTUDIO**

Durante la fase de insulinitis que precede a la aparición clínica de la diabetes autoinmunitaria, se encuentran linfocitos B infiltrando los islotes pancreáticos, junto con los linfocitos T. No obstante, hasta la fecha, se han llevado a cabo pocos estudios orientados a la caracterización de esta población de linfocitos B infiltrantes, en el modelo de ratón NOD, habiéndose publicado además resultados contradictorios [Kendall et al., 2004; Hussain et al., 2004; Hussain et al., 2005]. Tampoco se han analizado, hasta el momento, las posibles diferencias entre las poblaciones de linfocitos B que forman parte de infiltrados de tipo “benigno” (insulinitis no destructiva) o infiltrados efectores. Por esta razón, uno de los principales objetivos del estudio descrito en esta memoria ha sido la caracterización sistemática de las características fenotípicas y funcionales la población de linfocitos B que infiltran los islotes pancreáticos, en el origen y desarrollo de la diabetes de tipo 1, en distintas etapas evolutivas de la enfermedad, en cepas murinas susceptibles y resistentes.

Por otra parte, en un trabajo previo publicado por nuestro grupo [Carrillo et al., 2005] se caracterizó la diversidad antigénica de los linfocitos B infiltrantes en islotes pancreáticos, tanto en la cepa NOD como animales resistentes F1(NOD x NOR), así como en el modelo 8.3-NOD, transgénico para un TCR altamente diabetogénico. Este estudio, se llevó a cabo mediante la generación de líneas estables de hibridomas. El análisis de los clones secretores de anticuerpos reveló que, en contra de lo esperado, pocos de ellos eran específicos de autoantígenos de islote. Curiosamente, se observó una predominancia de líneas productoras de anticuerpos monoclonales específicos para elementos del sistema nervioso periférico (Fig. 12). Estos hibridomas, todos ellos de isotipo IgG2b o IgG2c, revelan la importancia de la respuesta “in situ” de los linfocitos B específicos para elementos del sistema nervioso que



inerva los islotes. Esta respuesta no parece ser secundaria a la desestructuración de los islotes, puesto que esta predominancia fue observada incluso en los modelos resistentes, que presentan insulitis benignas. Puesto que el/los antígenos de origen neuronal reconocidos por estos linfocitos B infiltrantes podrían ser dianas clave en las fases iniciales del desarrollo de la diabetes, la caracterización molecular de éstos antígenos ha sido también abordada en el presente estudio.



**Figura 12.** Patrón de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales específicos de elementos del sistema nervioso periférico. Inmunofluorescencia realizada sobre tejido pancreático de ratón (NOD.RAG2<sup>-/-</sup>) utilizando sobrenadante de uno de los hibridomas con este patrón (228E1), como anticuerpo primario. En el centro de la imagen se observa un islote, parcialmente rodeado de estructuras nerviosas, que son reconocidas por el anticuerpo monoclonal. (x200)





## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Nuestra hipótesis es que la población de linfocitos B que forma parte del infiltrado leucocitario en los islotes pancreáticos puede presentar cualidades funcionales distintivas, que aporten la capacidad de regular “in situ” la actividad de los linfocitos T autorreactivos. De esta manera, los linfocitos B infiltrantes de islotes podrían tener un papel determinante en el progreso de la insulinitis y la destrucción de la masa celular beta.

Por otro lado, la especificidad de los linfocitos B infiltrantes podría ser un factor clave en la capacidad reguladora de los mismos, puesto que la interacción directa con los linfocitos T depende de la presentación de péptidos vía MHC. En este sentido, nuestra hipótesis es que el patrón neuronal predominante observado en los linfocitos B procedentes del infiltrado intransular podría deberse al reconocimiento de un autoantígeno de expresión restringida a sistema nervioso periférico, no descrito hasta el momento.

Los objetivos planteados en este estudio son los siguientes:

- I. Caracterización fenotípica y funcional de la población de linfocitos B que infiltran los islotes pancreáticos, en diferentes modelos murinos de susceptibilidad/resistencia a la diabetes:
  - Caracterización fenotípica de los linfocitos B periféricos (esplénicos) en ratones NOD; análisis comparativo con la cepa NOR, con susceptibilidad genética a trastornos de tipo autoinmunitario, pero resistente a diabetes. Comparación con la cepa control BALB/c.
  - Seguimiento de la evolución de la población de linfocitos B, dentro del infiltrado, en las diferentes etapas de la T1D.
  - Caracterización fenotípica de los linfocitos B infiltrantes en islotes. Estudio comparativo del infiltrado “benigno”, propio de animales F1(NODxNOR), e infiltrado “destrutivo”, característico de animales NOD.
  - Caracterización de la respuesta a la activación “in vitro” en los linfocitos B infiltrantes.
  - Análisis diferencial de la producción de citoquinas en la población de linfocitos B infiltrantes.
  - Determinación de la capacidad de los linfocitos B infiltrantes para regular la activación de linfocitos T.

## II. Hipótesis y objetivos

II. Caracterización antigénica del patrón de reconocimiento neuronal, predominante en la población de linfocitos B infiltrantes.

- Determinación del patrón de expresión tisular del antígeno
- Identificación molecular del antígeno
- Análisis del reconocimiento diferencial de las distintas isoformas del antígeno



### III. MATERIAL Y MÉTODOS





## 1. ANIMALES: CONDICIONES DE ESTABULACIÓN Y MANTENIMIENTO

En este estudio se ha utilizado, como modelo de diabetes tipo 1, la cepa de ratón NOD (Non-Obese Diabetic), que desarrolla de forma espontánea una forma de diabetes autoinmunitaria muy similar a la humana. Como modelos de resistencia a la enfermedad, se ha estudiado la cepa NOR (Non-Obese Resistant), que aunque genéticamente muy similar a NOD no presenta insulinitis ni diabetes, y F1(NOD x NOR), primera generación resultado del cruzamiento entre NOD y NOR, que muestra resistencia a diabetes aunque sí presenta insulinitis. Por otro lado, se ha utilizado la cepa BALB/c como modelo murino sin susceptibilidad a presentar patologías autoinmunitarias. Las parejas fundadoras de cada una de las colonias procedían de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine), y la congénica de cada una de las cepas se ha conservado manteniendo la consanguinidad en los cruzamientos.

Tanto en el diseño experimental de los estudios, como en el mantenimiento diario de los animales, se siguieron las directrices publicadas en el Decreto de Regulación de la Utilización de Animales para la Experimentación de la Generalitat de Catalunya (en el marco de las Directivas del Consejo Europeo), para el uso y cuidado de los animales de laboratorio, bajo la supervisión del Comité Ético para la Experimentación Animal del Hospital Germans Trias i Pujol.

Dado que la frecuencia de aparición de la diabetes en los ratones NOD se ve influenciada por factores ambientales, éstos fueron especialmente tomados en consideración. Por esta razón, los animales fueron mantenidos en una unidad libre de patógenos (SPF, *specific pathogen-free*); ésta es una zona de estabulación con presión positiva, en la cual los procedimientos de trabajo están diseñados con el fin de mantener las condiciones de esterilidad. Para minimizar el riesgo de entrada de posibles patógenos por vía enteral, el alimento suministrado a los animales era irradiado (no es posible autoclavarlo, ya que el tratamiento a alta temperatura altera la composición) y el agua de bebida autoclavada. Asimismo, también fue esterilizado, o desinfectado con un agente bactericida y virucida (Virkon, 132035, Bayer), todo aquel material que fue utilizado en la zona SPF (jaulas, serrín para el lecho de las jaulas, etiquetas, ropa de trabajo, etc.).

Para seguimiento de la diabetes se utilizaron tiras reactivas colorimétricas para la detección de glucosa en orina (Chroma2, CK105, Menarini Diagnostics). La positividad de las tiras (>250mg/100ml), en dos días consecutivos, fue considerado como diagnóstico de debut clínico de diabetes.

En estas condiciones, un 85% de hembras y un 37% de machos de nuestra colonia de ratones NOD desarrollaron T1D antes de las 32 semanas de edad, con un máximo de incidencia entre

las 20-25 semanas. En contraposición, ningún animal NOR presentó diabetes, mientras que sólo un 19% de las hembras F1(NODxNOR) desarrollaron la enfermedad.

## 2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

El análisis histológico de los islotes pancreáticos de animales NOD, tenía como objetivo la determinación de la distribución espacial de los linfocitos B dentro del infiltrado, así como la posible proliferación de los mismos "in situ".

### 2.1. OBTENCIÓN DE CRIOSECCIONES

Para la obtención de órganos los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Tras realizar una incisión a lo largo de la línea media del animal y dejar al descubierto la cavidad abdominal, el páncreas fue extraído e inmediatamente congelado en isopentano durante al menos 3 minutos, manteniendo el recipiente con isopentano sumergido en un baño de acetona con nieve carbónica. Desde ese momento, las muestras fueron criopreservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Los cortes histológicos se obtuvieron a partir de los bloques de tejido congelados, utilizando un criostato (2800 Frigocut N, Reichert-Junc), con el fin de conseguir criosecciones de un grosor de  $5\mu\text{m}$ . Los cortes, recogidos sobre portaobjetos (Multispot microscope slides, pH-005, Hendley-Essex), fueron fijados mediante secado durante 30 minutos con un ventilador doméstico, antes de proceder con la tinción histológica o de nuevo a su conservación a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. TINCIÓN HISTOLÓGICA MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

Las criosecciones, de  $5\mu\text{m}$  de grosor, fueron descongeladas y fijadas mediante secado utilizando un ventilador, durante un mínimo de 30 minutos (no se utilizó ninguna solución fijadora, con el fin de evitar posibles alteraciones en los epítomos reconocidos por los anticuerpos primarios utilizados).

Con el objetivo de localizar la posición relativa de los linfocitos B, objeto principal del estudio, en relación al resto de poblaciones celulares que se encuentran en el infiltrado pancreático de los ratones NOD durante la insulitis, se realizaron tinciones dobles sobre las secciones de páncreas, con los anticuerpos descritos en la tabla 8.

En primer lugar, los cortes fueron rehidratados con PBS (preparado a partir de *Phosphate Buffered Saline* 10X pH 7.4, 1666789, Roche) durante 10 minutos, antes de ser incubados con los correspondientes anticuerpos primarios anti-células T, dendríticas o macrófagos (Tabla 8). Para la tinción, se dispensaron  $50\mu\text{l}$  del correspondiente sobrenadante, sin diluir, sobre cada una de los cortes histológicos, siguiéndose una incubación durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en

cámara húmeda. Tras la eliminación del anticuerpo no unido mediante dos lavados con PBS, de 5 y 10 minutos respectivamente, las secciones fueron incubadas durante 1 hora, a 4°C y en oscuridad, con 50 µl del correspondiente anticuerpo secundario marcado con fluoresceína: anti-rat IgG+M (3010-02, Southern) o anti-hamster IgG (HA6101, Caltag), ambos preparados a una dilución 1/100 en PBS + 1% FBS (Suero fetal bovino, 10270-106, Gibco). Tras lavar nuevamente las secciones, se realizó la tinción con el anticuerpo primario anti-células B marcado con biotina (50 µl por muestra) diluido 1/100 en PBS + 1% FBS, durante 1 hora a 4°C en oscuridad. Después de eliminar el exceso de anticuerpo, las muestras fueron finalmente incubadas con streptavidina marcada con rodamina, diluida 1/100 en PBS + 1% FBS, durante 30 minutos a 4°C, también en oscuridad. Tras un último lavado de las secciones con PBS, éstas fueron cubiertas con el medio Fluoprep (75521, bioMérieux) y un cubreobjetos. Finalmente las muestras fueron selladas con esmalte transparente para evitar su deshidratación, y mantenidas a 4°C y en oscuridad hasta el momento de ser visualizadas mediante microscopía de fluorescencia.

**Tabla 8.** Anticuerpos primarios utilizados en las tinciones histológicas.

<b>POBLACIÓN CELULAR</b>	<b>ANTICUERPO PRIMARIO</b>
Linfocitos T CD4+	rat anti-CD4 (clon GK1.5, ATCC)
Linfocitos T CD8+	rat anti-CD8 (clon Lyt2.2, ATCC)
Macrófagos	rat anti-F4/80 (clon HB-198, ATCC)
Células dendríticas	hamster anti-CD11c (clon N418, ATCC)
Linfocitos B	rat anti-CD45R/B220-BIOTIN (clon RA3-6B2, BD)

Alternativamente, para analizar la posible proliferación de los linfocitos B en el propio infiltrado, las secciones fueron teñidas utilizando anti-Ki67 (NCL-ki67p, NovoCastra) como anticuerpo primario, a una dilución 1/500 en PBS + 1% FBS. Ki67 es una proteína nuclear expresada en células en división (fases G1 tardía, S, M y G2). Este marcaje fue revelado utilizando un anticuerpo secundario goat anti-rabbit marcado con fluoresceína (4052-02, Southern) a una dilución 1/100. Seguidamente, las secciones fueron teñidas, tal como se ha descrito anteriormente, para la localización de las células B.

En todos los casos, se preparó siempre un control negativo, que consistió en una sección donde no se aplicaron los anticuerpos primarios, aunque sí fue incubada, como el resto de muestras, con los anticuerpos secundarios. De esta manera se descartaron posibles reactividades cruzadas de los anticuerpos secundarios con elementos propios del tejido, asegurando así la correcta especificidad de las tinciones.

Una vez finalizada la tinción de las preparaciones, éstas fueron visualizadas utilizando un microscopio de fluorescencia (Axioskop2, Zeiss), y las imágenes se obtuvieron a través de una cámara de vídeo (Hamamatsu Color Chilled 3CCD camera C5810) y el software Openlab (V2.1.1, Improvision). Las imágenes finales de las inmunofluorescencias dobles se obtuvieron mediante la solapación de imágenes (opción "Merge RGB planes") obtenidas con los diferentes filtros de fluorescencia, sobre la misma muestra.

## **3. ANÁLISIS DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

Para poder analizar la expresión de antígenos de superficie celular en diferentes poblaciones de linfocitos B mediante citometría de flujo, era necesario disponer de una suspensión celular representativa de cada muestra. Con este fin, se siguieron diferentes protocolos para la obtención de suspensiones celulares, según el órgano de origen (páncreas, bazo y ganglios linfáticos).

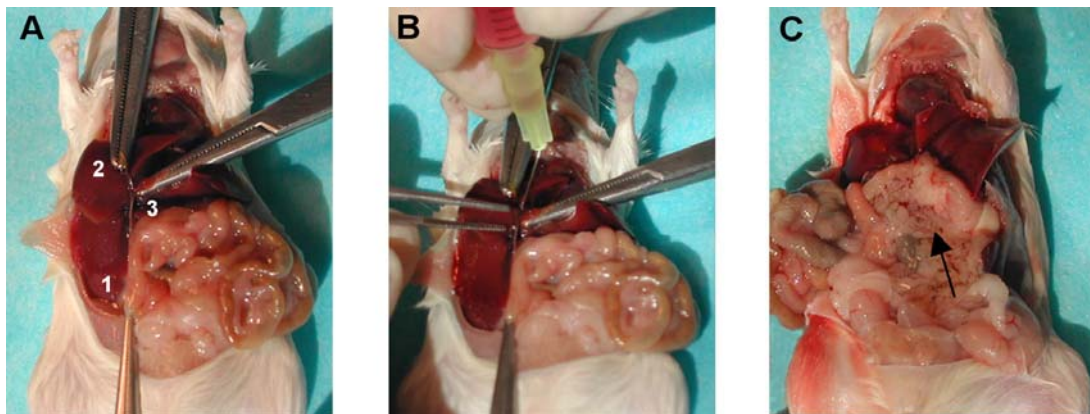
### **3.1. AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS MEDIANTE DIGESTION CON COLAGENASA**

El objetivo de esta técnica era eliminar de la muestra la porción correspondiente al tejido exocrino, que es el mayoritario en el páncreas. Era imprescindible seguir un protocolo de purificación de islotes pancreáticos, ya que en nuestro caso nos interesaba analizar específicamente la población de células infiltrantes en los islotes, y no los leucocitos que se pueden encontrar diseminadas en el tejido intersticial o circulando por los vasos sanguíneos.

Se utilizó Colagenasa tipo IV (CLS-4, Whorthington) para disgregar el páncreas con el fin de poder aislar los islotes; a diferencia de otras enzimas como la tripsina, la colagenasa tiene un menor efecto proteolítico sobre las proteínas que se encuentran en la superficie celular, lo cual es de vital interés para el posterior análisis de marcadores de superficie. La colagenasa se utilizó a una concentración equivalente a 470 U/ml, disuelta en HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution* 10X, 14060-040, GibcoBrl; diluido 1/10 en agua destilada + 0.35gr/L NaHCO<sub>3</sub>).

El protocolo quirúrgico seguido consistió en inyectar la solución de enzima colagenasa en el páncreas del animal, utilizando la vías naturales que representan el colédoco y el conducto pancreático. Obstruyendo el paso a través del resto de ramificaciones del colédoco, la colagenasa circula hacia el páncreas y difunde por todo el órgano, sin dirigirse a otros órganos que conectan con el mismo conducto (intestino e hígado). Para el éxito final de esta técnica, era imprescindible que se mantuviera inalterada la anatomía natural de los órganos adyacentes al páncreas, motivo por el cual la extracción del resto de órganos se realizó con posterioridad.

Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, y se realizó una incisión longitudinal en la línea media del animal, desde la parte inferior del abdomen hasta el tórax, abriendo lateralmente el campo de intervención en la medida de lo posible. También se retiró el tercio frontal de la caja torácica (costillas y esternón) con el fin de facilitar las siguientes maniobras. Apartando la masa intestinal hacia el lado izquierdo del animal, y un poco por debajo de la unión con el estómago, se localizó y pinzó la ampolla de Vater con una primera pinza tipo mosquito, obstruyéndose así el paso de líquido hacia intestino. Posteriormente se pinzaron también la vesícula biliar, con el segundo mosquito, y la rama lateral del colédoco, que se dirige hacia el hígado, con el tercer mosquito. De esta manera se obstruyó también el paso de líquido hacia el hígado (Fig. 13-A). Mientras el conducto colédoco se mantenía tenso mediante los mosquitos, éste fue canulado con una aguja de 30G, aprovechando el apoyo de una pinza fina dentada para sostener la aguja en el interior del conducto (Fig. 13-B). Tras la inyección de 3 ml de colagenasa fría, se comprobó que ésta había sido distribuida por todo el páncreas (Fig. 13-C).



**Figura 13.** Protocolo de inyección de colagenasa en páncreas. **A.** Pinzamientos a nivel de la ampolla de Vater (1), de la vesícula biliar (2) y de la ramificación hepática izquierda del colédoco (3). **B.** Inyección de colagenasa a través del colédoco. **C.** Detalle del páncreas dilatado, tras la inyección de colagenasa.

Tras la inyección de colagenasa, se procedió a la extracción de los órganos de interés. En primer lugar se extrajeron los ganglios linfáticos mesentéricos, que se encuentran formando una cadena en la línea media del mesenterio. A continuación se apartó cuidadosamente el intestino en toda su longitud, dejando al descubierto el páncreas en su totalidad. Posteriormente se recogió el bazo. Dejando a un lado el páncreas, se podían visualizar los ganglios pancreáticos, adyacentes a la cabeza del páncreas, por debajo del estómago. Estos ganglios regionales fueron extraídos aplicando una ligera tracción con unas pinzas. Estas tres muestras se recogieron en tubos conteniendo suero fisiológico frío, y fueron mantenidas en hielo, con el fin de evitar la actividad enzimática de la colagenasa (por si algún pequeño volumen hubiese ido a parar a éstos órganos durante la extracción, debido a su proximidad

### III. Material y Métodos

física con el páncreas). A continuación se extrajo el páncreas, inyectado previamente con colagenasa, evitando la grasa adyacente, ya que ésta dificulta el posterior procesamiento del órgano. El páncreas así obtenido fue mantenido también en un tubo en hielo (sin suero fisiológico en este caso) hasta el momento de la digestión.

La digestión del páncreas con la enzima colagenasa se realizó incubando la muestra en un baño a 37°C durante 20 minutos, tras los cuales se paró la digestión añadiendo 50 ml de HBSS frío. A continuación el tejido fue disgregado mecánicamente con una pipeta de 10 ml hasta obtener una suspensión homogénea. Tras la sedimentación de la muestra durante 7 minutos en hielo, durante la cual los islotes se depositaron en el fondo del tubo, el sobrenadante fue descartado, ya que contenía mayoritariamente restos de grasa y tejido exocrino. El sedimento fue recuperado y pasado a una cápsula de Petri (90 mm de diámetro), sobre la cual se recogieron los islotes pancreáticos manualmente con una pipeta y la ayuda de una lupa binocular a 15 aumentos (0-6.4X, 475057, Zeiss). Mediante este protocolo, se obtuvieron 50-200 islotes por muestra, según el grado de insulinitis. Finalmente, para obtener una suspensión celular, conteniendo linfocitos infiltrantes de los islotes para su posterior análisis mediante citometría, se procedió a una suave disgregación mecánica de los islotes de Langerhans recogidos, utilizando un homogeneizador manual de pistón (cuerpo de vidrio + émbolo de teflón).

#### **3.2. DISGREGACIÓN Y HEMÓLISIS DEL BAZO**

Antes de realizar un análisis mediante citometría sobre la muestra de bazo, era necesario obtener una suspensión celular y sobre ella realizar un proceso de hemólisis, para eliminar los eritrocitos (tienen un alto nivel de autofluorescencia, que podría interferir en el análisis de los resultados). Con esta finalidad, el órgano fue depositado en una cápsula de Petri conteniendo 10 ml de Solución de Hemólisis (140 mM NH<sub>4</sub>Cl en una solución 16,8 mM Tris) y disgregado mecánicamente utilizando la zona esmerilada de dos portaobjetos. Los hematíes fueron lisados en esta solución a temperatura ambiente durante 8 minutos, tras los cuales se añadieron, 40 ml de HBSS, para prevenir la lisis del resto de células. Posteriormente, se realizó un lavado de la muestra mediante centrifugación (450 xg durante 5 minutos) para finalmente resuspender el botón celular en HBSS.

#### **3.3. DISGREGACIÓN DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS**

En el caso de éstos órganos, el único proceso que se necesitó para conseguir la muestra adecuada para analizar mediante citometría, fue una disgregación mecánica utilizando portaobjetos esmerilados, de la misma manera que se ha descrito para el bazo.

### 3.4. CONTROL DE LA DIGESTIÓN CON COLAGENASA

En general, se considera que la enzima colagenasa tiene poco efecto proteolítico sobre las moléculas que se encuentran en la superficie de las células. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el preparado comercial de colagenasa puede contener, además, trazas de otras enzimas como la tripsina (variable según el lote utilizado), que pueden afectar en mayor grado a los antígenos de superficie. Con el objetivo de conocer hasta qué punto podía alterar la digestión con colagenasa, que se seguía en este protocolo, a la estructura de los diferentes antígenos de superficie, se realizaron controles de digestión sobre muestras de esplenocitos.

Así, una alícuota de la muestra de esplenocitos (5 millones de células) fue digerida con 1 ml de colagenasa en un baño a 37°C durante 45 minutos. Tras parar la digestión con HBSS y hacer un lavado para eliminar los restos de colagenasa, se procedió a la tinción, en paralelo con una muestra de esplenocitos sin digerir, para su posterior análisis mediante citometría de flujo.

Aunque en el protocolo de digestión del páncreas con la colagenasa, la digestión propiamente dicha tiene una duración de 20 minutos, se prefirió realizar los controles sobre muestras de esplenocitos con un tiempo de exposición a la colagenasa mucho mayor, para discernir claramente hasta qué punto se podían ver alterados cada uno de los marcadores de superficie.

### 3.5. MARCAJE DE ANTÍGENOS DE SUPERFICIE

Puesto que el citómetro utilizado (FacScan, BD) disponía de 3 canales de fluorescencia, en cada tubo de tinción se combinaron hasta 3 anticuerpos, de los descritos en la tabla 9, marcados directamente con los fluorocromos FITC (fluorescein) o PE (phycoerithrin), o bien ligados a biotina, que en un segundo paso fue revelada con estreptavidina marcada con el fluorocromo PerCP (peridinin chlorophyll protein).

Después de realizar el recuento celular de cada una de las muestras, se dispensaron 500.000 células por tubo y se lavaron con 2 ml de Facs Buffer (1% FBS y 0,1% azida sódica en PBS). Tras una centrifugación de 5 minutos a 450 xg se descartó el sobrenadante. En cada tubo se hicieron combinaciones de 3 anticuerpos marcados diferencialmente (PE, FITC y BIOTINA). El anticuerpo anti CD19-PE se utilizó en todos los tubos, con el fin de identificar, en todo momento, la población correspondiente a las células B, ya que eran el principal centro de interés en este estudio. Todos los anticuerpos primarios descritos en la Tabla 9 fueron utilizados a una dilución 1/100 en Facs Buffer. Así, para cada una de las tinciones, se diluyeron 0,5 µl de cada uno de los tres anticuerpos, en 50µl de Facs Buffer. Seguidamente, se resuspendieron las muestras de cada tubo en esta solución, y se realizó una incubación de 20 minutos a 4°C y en oscuridad. Para eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido se realizó un lavado de cada una de las muestras con 1 ml de Facs Buffer. Para aportar la tercera fluorescencia, se realizó una segunda tinción con estreptavidina conjugada con PerCP (BD

### III. Material y Métodos

Pharmingen), que se une a los anticuerpos marcados con biotina. Se utilizó una dilución 1/10 en Facs Buffer, resuspendiendo las células de cada tubo con 50 µl de esta dilución. La incubación de esta tinción también se realizó a 4°C durante 20 minutos en oscuridad. Finalmente, para eliminar el exceso de estreptavidina se realizó un último lavado de las muestras, y éstas fueron resuspendidas en 350 µl de Facs Buffer, para su posterior análisis mediante citometría de flujo.

**Tabla 9.** Anticuerpos monoclonales utilizados en la detección de antígenos de superficie para análisis mediante citometría de flujo. Todos ellos procedían de BD Pharmingen, excepto el anticuerpo anti-CD11c, que era de Southern Biotechnology Associates. Entre paréntesis se indica el nombre del clon productor del anticuerpo.

ANTICUERPO	TIPO DE MARCADOR DE SUPERFICIE
anti-CD19 – PE (1D3)	marcadores específicos de linfocitos B
anti-CD21 – FITC (7G6)	
anti-CD45R/B220 – FITC (RA3-6B2)	
anti-IgA – BIOTIN (C10-1)	isotipos de inmunoglobulina
anti-IgD – FITC (11-26c.2a)	
anti-IgG1 – BIOTIN (A85-1)	
anti-IgG2a2b – BIOTIN (R2-40)	
anti-IgG2b – BIOTIN (R12-3)	
anti-IgG3 – BIOTIN (R40-82)	
anti-IgM – BIOTIN (R6-60.2)	
anti-H-2K <sup>d</sup> – BIOTIN (SF1-1.1)	moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC de clase I y II respectivamente)
anti-I-A <sup>k</sup> – BIOTIN (10-3.6) , presenta reactividad cruzada con el alelo I-A <sup>g7</sup>	
anti-CD24 – FITC (M1/69)	indicador del estado de madurez y/o activación
anti-CD5 – FITC (53-7.3)	utilizados como marcadores de subpoblaciones linfocitarias B (B-1)
anti-CD11b - BIOTIN (M1/70)	
anti-CD44 – BIOTIN (IM7)	marcadores de activación
anti-CD40 – BIOTIN (3/23)	
anti-CD69 – FITC (H1.2F3)	
anti-CD80 – BIOTIN (16-10A1)	moléculas coestimuladoras (B7-1 y B7-2 respectivamente)
anti CD86 - BIOTIN (GL1)	

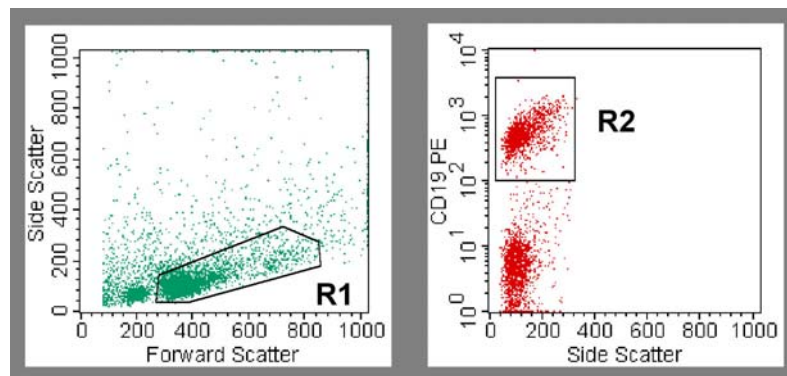
#### 3.6. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Las muestras fueron analizadas utilizando el equipo FACScan de Becton Dickinson y el software CellQuest, con los cuales se puede obtener información correspondiente a cinco parámetros, de cada una de las células analizadas: dispersión frontal (*forward scatter*), dispersión lateral (*side scatter*), y tres canales de fluorescencia.



Se capturaron, en el citómetro, 10000 eventos de cada uno de los tubos de tinción. La población correspondiente a los linfocitos vivos (R1), se seleccionó teniendo en cuenta los parámetros de dispersión frontal y lateral, y la viabilidad observada previamente mediante tinción con yoduro de propidio. Posteriormente, la población de linfocitos B, que es la que nos interesaba analizar, se identificó mediante la positividad para el marcador CD19 (R2) (Fig. 14).

En los casos en los que el histograma de fluorescencia para un determinado marcador mostraba claramente un único pico en la población de linfocitos B, se analizó el valor de la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI, del inglés *median fluorescence intensity*), ya que es una medida más robusta que la media, en el caso de poblaciones celulares poco abundantes. En cambio, cuando el histograma presentaba una amplia gradación en la expresión del marcador, o una distribución bi-modal, se analizó la proporción de células positivas. Se utilizó una muestra sin tñir para ajustar el umbral de positividad, para cada canal de fluorescencia.



**Figura 14.** Análisis de las muestras mediante citometría de flujo. Dentro de la población de linfocitos (R1), las células CD19+, correspondientes a los linfocitos B (R2), fueron analizadas para determinar los niveles de expresión de los diferentes antígenos de superficie.

### 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los valores mostrados en las gráficas de barras representan la media  $\pm$  error estándar de un mínimo de tres experimentos independientes. La comparativa estadística entre los diferentes grupos experimentales se realizó usando el Test U Mann-Whitney (SPSS y GraphPad Prism), indicado para tamaños muestrales pequeños.

## 4. DETECCIÓN DE CITOQUINAS INTRACELULARES

Con el objetivo de detectar la producción de citoquinas por parte de los linfocitos B, en las diferentes poblaciones estudiadas, se utilizaron técnicas de tinción intracelular y detección mediante citometría de flujo.

El nivel de producción de citoquinas por parte de linfocitos suele ser demasiado baja, en condiciones fisiológicas, para poder ser detectada mediante citometría de flujo. Por esta razón, previamente a la detección, se aplicó un agente estimulador, a la vez que se bloqueaban los mecanismos celulares de secreción, para potenciar la acumulación intracelular de las proteínas producidas. Posteriormente, para poder inmunodetectar estas citoquinas, fue necesario permeabilizar las células, para que los anticuerpos pudieran acceder a las vesículas de secreción donde habían quedado retenidas las citoquinas.

### 4.1. ACTIVACIÓN CELULAR Y BLOQUEO DE LA SECRECIÓN

El protocolo de recolección de órganos que se siguió para este análisis fue el mismo que se ha descrito anteriormente, para la obtención de muestras para análisis de antígenos de superficie mediante citometría de flujo, salvando las diferencias necesarias para preservar, en este caso, la esterilidad de las muestras. Por ello, se tuvo especial consideración en la desinfección del área de trabajo y del material quirúrgico.

Posteriormente, la disgregación mecánica del páncreas, así como la recolección de los islotes pancreáticos con la ayuda de la lupa binocular (descrita en la sección III.3.1.), fueron realizadas en una campana de flujo laminar. Los islotes recolectados fueron dispuestos en placas de 96 pocillos de fondo plano, a razón de 20 islotes por pocillo. Una vez sedimentados los islotes (5 minutos), se recogió el exceso de medio HBSS, y se les añadió 200  $\mu$ l de medio de cultivo completo [MCC: RPMI 1640 (31870-025, Gibco) + 10% FBS inactivado por calor + 2mM L-glutamina + 100 U/ml penicilina + 100  $\mu$ g/ml estreptomina + 1mM piruvato sódico + 25  $\mu$ M 2-mercaptoetanol]. Asimismo, se dispensaron  $2,5 \times 10^5$  esplenocitos por pocillo y éstos fueron puestos en cultivo de la misma manera, y en paralelo, a los islotes.

Para estimular la activación, y consecuente síntesis de citoquinas, se suplementaron los cultivos con 5 ng/ml de PMA (P-1585, Sigma) y 500 ng/ml de ionomicina (I-0634, Sigma), a la vez que se añadió monensina a una concentración final de 10  $\mu$ M (00-4505, eBioscience) para bloquear la secreción de las citoquinas producidas por las células. Tras 5 horas de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, las células fueron recogidas para ser analizadas mediante citometría de flujo.

Durante el tiempo de cultivo, además de activarse, los linfocitos infiltrantes de islote abandonaban los islotes y quedaban suspendidos en el medio de cultivo, facilitando así su

recolección y análisis mediante citometría, sin necesidad de disgregar mecánicamente la muestra.

#### 4.2. MARCAJE DE CITOQUINAS INTRACELULARES

Para la detección de citoquinas intracelulares se utilizó el kit “Ready-SET-Go! Intracellular Cytokine Staining Kit” (88-7777, eBioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit consta de la solución de monensina, la solución de fijación y la solución de permeabilización, así como los diferentes anticuerpos anti-citoquinas marcados con FITC, y sus correspondientes controles de isotipo, también marcados.

En primer lugar se procedió al marcaje de las células con anticuerpo anti-CD19 PE (1D3, BD Pharmingen), que nos serviría posteriormente para identificar la población de linfocitos B. Para ello se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente (sección III.3.5.) para la detección de antígenos de superficie, con la modificación de añadirle monensina 10 $\mu$ M al FACS buffer (1% FBS y 0,1% azida sódica en PBS) durante la tinción, para evitar que se perdieran en este paso las citoquinas acumuladas en el interior de las células.

Tras el último lavado de la tinción de superficie, se añadieron 100  $\mu$ l de solución de fijación (4% paraformaldehído) a las células, con especial atención de resuspender las células a conciencia (vórtex al menos durante un minuto). Se dejó actuar la solución de fijación durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, y después se realizaron dos lavados con 1 ml de solución de permeabilización (0,1% saponina) cada uno, tras los cuales se incubaron las células en 100  $\mu$ l de solución de permeabilización durante otros 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Para realizar la tinción con anticuerpos anti-citoquinas (Tabla 10) se dispensaron 20  $\mu$ l (equivalente a 0,2  $\mu$ g) de los anticuerpos correspondientes a cada muestra, y se incubaron durante 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Para eliminar el anticuerpo no unido tras la incubación, se realizó un lavado de las muestras con 1 ml de solución de permeabilización. Finalmente las células fueron resuspendidas en 350  $\mu$ l de solución de permeabilización para su análisis mediante citometría de flujo.

**Tabla 10.** Anticuerpos anti-citoquinas marcados con FITC y correspondientes controles de isotipo.

ANTICUERPO	CONTROL ISOTIPO
anti-IFN $\gamma$ FITC (XMG1.2)	FITC Rat IgG1 (eBRG1)
anti-IL-4 FITC (BVD6-24G2)	FITC Rat IgG1 (eBRG1)
anti-IL-10 FITC (JES5-16E1)	FITC Rat IgG2b (eBRG2b)

### **4.3. ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

Las muestras fueron analizadas utilizando el equipo FACScan de Becton Dickinson y el software CellQuest. Como se ha comentado anteriormente, la población correspondiente a los linfocitos vivos se seleccionó teniendo en cuenta los parámetros de dispersión frontal y lateral, y la población de linfocitos B, que es la que nos interesaba analizar, se identificó mediante la positividad para el marcador CD19.

El marcaje positivo para IFN $\gamma$  de un 20% de las células CD8+ procedentes de los cultivos de esplenocitos fue considerado como control positivo de que la técnica funcionaba adecuadamente.

El umbral de positividad para cada tinción fue ajustado, para cada muestra, a partir del análisis de la tinción con el anticuerpo de control isotípico correspondiente, con un nivel máximo de tolerancia de un 1% de células positivas en el control negativo (por lo tanto, porcentajes inferiores a 1% en las muestras teñidas con los anticuerpos anti-citoquinas no deberían ser tomados en consideración).

## **5. ESTIMULACIÓN “IN VITRO” DE LINFOCITOS B PROCEDENTES DE INFILTRADO PANCREÁTICO**

Con el objetivo de caracterizar la respuesta de las diferentes poblaciones de linfocitos B, frente a diversos agentes estimuladores, se realizaron ensayos de estimulación "in vitro" utilizando muestras procedentes de páncreas y bazo (control).

El protocolo de recolección de los órganos necesarios para este estudio fue el mismo que se ha descrito anteriormente para el análisis de antígenos de superficie (III.3.1. y III.3.2.), manteniendo, como en el caso de la extracción de órganos para la detección de citoquinas intracelulares, la esterilidad de las muestras, puesto que iban a ser cultivadas “in vitro”.

### **5.1. CONDICIONES DE CULTIVO**

Los islotes y esplenocitos fueron dispuestos en placas de cultivo de 96 pocillos, tal como se describe en la sección III.4.1., en 200  $\mu$ l de MCC.

Algunos cultivos fueron suplementados con 10  $\mu$ g/mL LPS (serotipo 0111:B4, L3012, Sigma-Aldrich Chimie), que produce una activación policlonal de los linfocitos B via TLRs. Otros, en cambio, fueron activados con 10 $\mu$ g/mL anti-CD40 (no azide/low endotoxin, clone 3/23, BD Pharmingen) + 10 U/mL IL-4 (404-ML-005, R&D Systems), estimulando las mismas vías de señalización que están implicadas en la activación mediada por células T. Los controles

negativos consistieron en cultivos sin estimular; con medio de cultivo completo sin suplementar. Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C con 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

## 5.2. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS LINFOCITOS B ACTIVADOS

A tiempo 0, así como a las 24 y 48 horas después del inicio del cultivo, se recogieron las suspensiones celulares y se analizó la expresión de antígenos en la superficie de las células B. Los protocolos de tinción y detección seguidos en este ensayo fueron los mismos descritos anteriormente en los apartados III.3.5. y 3.6.

## 6. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T

Los ensayos de proliferación realizados tenían como objetivo medir la capacidad de las diferentes poblaciones de linfocitos B para activar o inhibir la proliferación de linfocitos T autólogos. El protocolo utilizado fue una adaptación de la metodología clásica (Current Protocols in Immunology, 1991) para muestras pequeñas. En este sentido, se sustituyó la medición de la proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada, por el seguimiento de las divisiones celulares mediante tinción intracelular con CFSE (carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester).

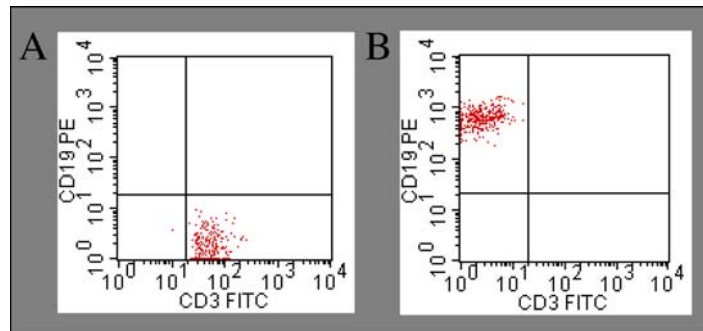
### 6.1. PURIFICACIÓN DE POBLACIONES LINFOCITARIAS T Y B MEDIANTE SORTING

El protocolo de obtención de esplenocitos e infiltrado de islotes fue el mismo que se ha descrito para el análisis de antígenos de superficie, manteniendo las condiciones de esterilidad para que las muestras pudieran ser cultivadas posteriormente. A continuación, se procedió con el protocolo de sorting para purificar, por un lado la población de linfocitos T (CD3+) y por otro la de linfocitos B (CD19+), tanto procedentes de bazo como de islotes.

Tras realizar un recuento celular de las muestras obtenidas, se dispensaron un máximo de  $2,5 \times 10^6$  células por tubo (uno para bazo y otro para islotes). Para eliminar restos de otras soluciones, las muestras fueron diluidas en 4 ml de Sorting Buffer (1% FBS en PBS + 100 U/ml penicilina + 100 µg/ml estreptomina) y después fueron centrifugadas durante 5 minutos a 450 xg, tras lo cual se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 250 µl de Sorting Buffer y se añadieron 2,5 µl de cada uno de los anticuerpos FITC anti-CD3 (clon 17A2, BD Pharmingen) y PE anti-CD19 (clon 1D3, BD Pharmingen), a lo que siguió una incubación de 20 minutos a 4°C y en oscuridad. Tras el marcaje, las muestras fueron resuspendidas en 1,5 ml de Sorting Buffer y filtradas (*Pre-separation Filters*, poro 30 µm, 130-041-407, Miltenyi Biotec GmbH) para evitar obturaciones en los conductos del Sorter. El proceso de purificación de las poblaciones de células CD3+ y CD19+ se llevó a cabo mediante el equipo sorter FACS Vantage de Becton Dickinson, previamente acondicionado con PBS estéril como líquido de flujo

### III. Material y Métodos

para evitar contaminaciones de las muestras. Durante este proceso se recogieron, de forma paralela, las poblaciones CD3+ y CD19+ en sendos tubos conteniendo 2,5 ml de medio de recogida (medio de cultivo completo suplementado con 20% de FBS) cada uno y mantenidos en frío. En todos los casos la pureza de las poblaciones obtenidas, analizada posteriormente mediante citometría de flujo, fue superior al 98% (Fig. 15).



**Figura 15.** Poblaciones linfocitarias purificadas mediante sorting.  
**A.** Linfocitos T (CD3+). **B.** Linfocitos B (CD19+)

#### 6.2. MARCAJE INTRACELULAR DE LINFOCITOS T CON CFSE

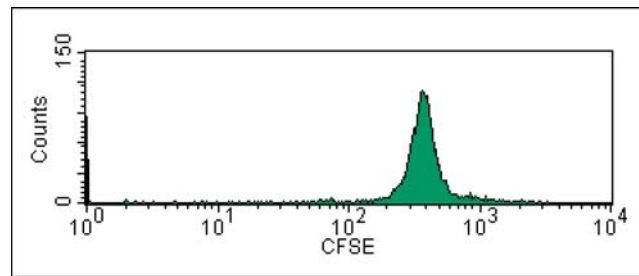
Para hacer el seguimiento de la proliferación de los linfocitos T se marcaron las células intracelularmente con CFSE, de esta manera fue posible realizar los ensayos de proliferación en muestras más pequeñas de lo habitual en otras técnicas como la medida de la incorporación de timidina tritiada. El tamaño de las poblaciones celulares purificadas era un factor limitante en este estudio, especialmente en el caso de los linfocitos procedentes de infiltrado de islotes.

En primer lugar se realizó un recuento de las células T, previamente purificadas mediante sorting. Tras centrifugar la muestras durante 5 minutos a 450 xg, se descartó el medio de recogida y se resuspendieron los botones celulares en el volumen adecuado de suero fisiológico, de manera que la concentración celular final fuera equivalente a 5 millones por milímetro.

El CFSE (C-1157, Molecular Probes) preparado a partir de un solución de trabajo 5mM en DMSO, fue diluido 1/4000 en suero fisiológico (concentración final 1,25  $\mu$ M). En un tubo tipo eppendorf se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión celular y la dilución 1/4000 del CFSE, y se siguió una incubación en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente. En este paso era importante que no quedasen restos del medio de recogida, ya que las proteínas procedentes del FBS podían dificultar la entrada del CFSE en las células. Tras la incubación, la tinción intracelular se bloqueó con un volumen igual de FBS (inactivado por calor), durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Para eliminar el CFSE no

internalizado y el FBS, se hicieron dos lavados de las células con suero fisiológico, consistentes en sendas centrifugaciones durante 5 minutos a 300 xg seguidas de la eliminación del sobrenadante. Finalmente, las células fueron resuspendidas en medio de cultivo completo.

Un pequeño volumen de muestra (5  $\mu$ l) fue suficiente para comprobar, mediante detección de la fluorescencia del CFSE con el citómetro de flujo, que el marcaje se había realizado con éxito (Fig. 16).



**Figura 16.** Histograma obtenido mediante citometría de fluorescencia, de una población purificada de linfocitos T marcada con CFSE.

### 6.3. CULTIVOS MIXTOS

Tras obtener las poblaciones purificadas de linfocitos B y T, y habiendo también marcado éstos últimos con CFSE, se realizó un último recuento celular de todas las muestras resuspendidas en medio de cultivo completo. Se dispensaron, en pocillos de placas de cultivo de 96 pocillos con fondo redondeado, la cantidad indicada de cada una de las poblaciones celulares, ajustando todos los pocillos a un volumen final de 200  $\mu$ l totales con MCC. Algunos cultivos se suplementaron con anti-CD3 (unido a placa o soluble), extracto de islotes (aprox. 10 islotes por pocillo, lisados mediante ciclos de congelación/descongelación) y/o 10  $\mu$ g/ml de anti-CD40 (NA/LE, clon 3/23, BD Pharmingen).

Cuando el anticuerpo anti-CD3e (NA/LE, clon 145-2C11, BD Pharmingen) es aplicado en forma soluble (5  $\mu$ g/ml) es necesario añadir células accesorias al cultivo (células con función presentadora) para que los linfocitos T proliferen. Sin embargo, la adhesión de anti-CD3e a la superficie de la placa de cultivo produce un efecto independiente de células accesorias, induciendo la activación de los linfocitos T. Para adherir el anticuerpo anti-CD3e a las placas de cultivo se preparó una dilución 10  $\mu$ g/ml de dicho anticuerpo en PBS y se dispensaron 30  $\mu$ l de esta dilución en cada pocillo. Tras una incubación de 90 minutos a 37°C se realizaron 3 lavados consecutivos de los pocillos, cada uno con 200  $\mu$ l de PBS frío. Tras el último lavado, se

### III. Material y Métodos

añadieron 100 µl de PBS por pocillo; las placas así preparadas se guardaron a 4°C hasta el momento del establecimiento del cultivo (máximo 24 horas).

#### 6.4. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Después de 3 días de cultivo, las células fueron recogidas y resuspendidas en FACS Buffer (PBS + 1% FBS + 0,1% azida sódica) para su análisis mediante citometría de flujo.

La intensidad del marcaje intracelular de CFSE se reduce a la mitad en cada división porque es repartido a partes iguales en las células hijas; con lo que se puede inferir que la pérdida de intensidad de fluorescencia en la población analizada es directamente proporcional a la proliferación que ha tenido lugar en la población celular marcada.

## 7. INMUNODETECCIÓN DE ANTÍGENOS

### 7.1. HIBRIDOMAS

Como se ha comentado previamente, para este estudio de caracterización antigénica, se seleccionaron aquellos hibridomas con patrón neuronal (Tabla 11), 21 en total.

**Tabla 11.** Lista de hibridomas analizados, e isotipo de inmunoglobulina que presentan.

HIBRIDOMA	ISOTIPO
228E1	IgG2b
184F6	IgG2b
263B	IgG2b
161A	IgG2b
258A	IgG2c
259B	IgG2c
293A	IgG2c
260D	IgG2b
39C1	IgG2b
I6	IgG2b
36B	IgG2b
182B1	IgG2c
35A	IgG2b
246A3AA	IgG2b
280A	IgG2b
186A	IgG2b
271F3A	IgG2b
135A	IgG2c
170B1B	IgG2c
166I	IgG2b
400A2	IgG2c



A pesar de presentar el mismo patrón de reconocimiento sobre tejido, estos 21 hibridomas proceden de distintos clones de linfocitos B, como se ha comprobado mediante la secuenciación de la región variable tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera de la inmunoglobulina [Carrillo et al., publicación en preparación].

Para caracterizar la especificidad antigénica de los anticuerpos monoclonales producidos por estos hibridomas, los diferentes clones fueron cultivados en frascos de 25cm<sup>2</sup>, en medio de cultivo completo (MCC). Cada 3 días, se recuperó el sobrenadante, conteniendo el anticuerpo monoclonal producido, cambiándolo por MCC fresco. Estos sobrenadantes fueron filtrados (poro de 45µm, para eliminar restos celulares) y conservados a -20°C, para su posterior utilización en los ensayos de inmunodetección.

#### 7.2. LÍNEAS CELULARES

En primer lugar, se testaron diferentes líneas celulares como posibles fuentes de antígeno, mediante tinción intracitoplasmática sobre las propias células en cultivo. En una segunda fase, se detectó la presencia del antígeno en extractos proteicos procedentes de los mismos cultivos celulares, mediante Western blot, para determinar la localización y peso molecular del antígeno.

Las líneas celulares que se testaron, como posible fuente de antígeno fueron las siguientes:

- **N1E-115:** Neuroblastoma murino (ATCC#CRL-2263)
- **NIT-1:** Insulinoma murino, cepa NOD (ATCC#CRL-2055)
- **SK-N-SH:** Neuroblastoma humano (ATCC#HTB-11)
- **SV-T2:** Fibroblasto embrionario murino (ATCC#CCL-163.1), utilizado como control negativo

En primer lugar, se establecieron cultivos de cada una de las líneas celulares. En cada caso, al tercer día después de haber iniciado el cultivo, se realizó un test para detectar contaminación por Mycoplasma, mediante PCR de una muestra de sobrenadante del cultivo (Anexo 1). Sólo fueron utilizados para la detección de antígenos, aquellos cultivos libres de contaminación.

#### 7.3. TINCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA DE CÉLULAS ADHERENTES EN CULTIVO

En este estudio, se utilizó esta técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar, sobre las diferentes líneas celulares, la presencia y distribución celular del antígeno reconocido por los anticuerpos monoclonales, producidos por los hibridomas con patrón neuronal.

Para poder visualizar las estructuras intracelulares manteniendo, en el mayor grado posible, la integridad de las propias células, se hizo un cultivo celular sobre portaobjetos (Multispot

### III. Material y Métodos

microscope slides, pH-005, Hendley-Essex); sobre este soporte se fijaron y permeabilizaron las células, previamente a la inmunodetección.

En primer lugar, se recogieron células de los cultivos preestablecidos de cada una de las líneas celulares. Dado que se necesitaban pocas células para realizar este ensayo, se optó siempre por recuperar las células del cultivo mediante métodos “suaves”, como lavados de los frascos con PBS. Se evitó la utilización de tripsina por su potente acción proteolítica, lo cual podía afectar negativamente a la posterior detección de antígenos. Tras el recuento celular, se dispensaron  $2,5 \times 10^4$  células por pocillo, en los portaobjetos, y se añadieron 100  $\mu$ l de medio de cultivo completo. Los portaobjetos se colocaron dentro de cápsulas de Petri, sobre un lecho de gasas húmedas, para evitar la evaporación del medio de cultivo. Los cultivos se incubaron un mínimo de 3 horas (hasta 12 horas) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, tiempo durante el cual las células se adherían a la superficie del portaobjetos. Los cultivos, adheridos al portaobjetos, fueron lavados brevemente con PBS para eliminar el MCC, antes de incubarlos con 100  $\mu$ l por pocillo de la solución de fijación (*Fixation Buffer* correspondiente al Kit de Tinción Intracelular de eBioscience, contiene 4% formaldehído) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres incubaciones consecutivas, de 5 minutos cada una, con 100  $\mu$ l por pocillo de solución de permeabilización (*Permeabilization Buffer* del kit de Tinción Intracelular, contiene 0,1% saponina). Finalmente, se realizaron dos lavados de los pocillos con PBS, antes de continuar con la inmunodetección.

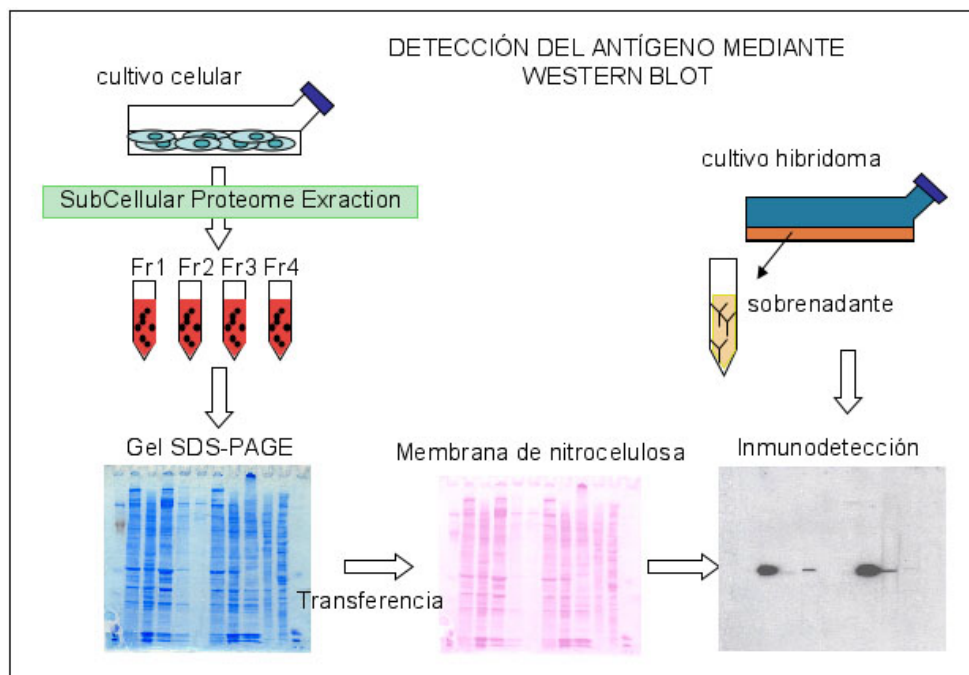
Los cultivos, fijados sobre los portaobjetos y permeabilizados, fueron incubados durante toda una noche a 4°C con 50  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo del hibridoma correspondiente, conteniendo el anticuerpo monoclonal producido, sin diluir. Posteriormente, el exceso de anticuerpo no unido fue eliminado mediante dos lavados con PBS, de 5 y 10 minutos respectivamente, antes de teñir la muestra con el anticuerpo secundario. En este caso, como todos los sobrenadantes de hibridomas testados eran inmunoglobulinas de ratón de isotipo IgG2b, se utilizó un anticuerpo secundario anti-mouse IgG2b marcado con Alexa-488 (A-21141, Molecular Probes), diluido 1/800 en PBS con 1% de suero fetal bovino. De nuevo, el excedente de anticuerpo fue eliminado mediante lavados con PBS, antes de montar la preparación con Fluoprep. Como control negativo se utilizó un cultivo que había sido incubado toda la noche con un anticuerpo control del mismo isotipo (mouse IgG2b clone eBMG2b, dilución 0,01 mg/ml, eBioscience) y teñido posteriormente con anti-mouse IgG2b, como el resto de muestras.

Las preparaciones teñidas fueron visualizadas mediante microscopía de fluorescencia, utilizando el equipo descrito en el apartado III.2.2.

## 7.4. WESTERN BLOT

El objetivo de la utilización de Western blots fue la detección de antígenos en los extractos proteicos derivados de líneas celulares. El nivel de sensibilidad de las técnicas de inmunoblot (del orden de nanogramos) es mayor que el de la inmunofluorescencia indirecta, además aporta información relativa al peso molecular de la proteína detectada.

En primer lugar, se realizó una extracción de proteínas de las muestras celulares, siguiendo un protocolo de extracción fraccionada que permitió separar, y enriquecer, las proteínas pertenecientes a diferentes localizaciones subcelulares. Las proteínas obtenidas fueron desnaturalizadas y separadas, en función de su peso molecular, en geles de poliacrilamida y posteriormente electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Con los sobrenadantes de los hibridomas se llevó a cabo la inmunodetección, sobre las proteínas fijadas sobre la membrana (Fig. 17).



**Figura 17.** Esquema general de la estrategia de extracción de proteínas e inmunodetección mediante Western blot.

### 7.4.1. Extracción de proteínas

Para realizar la extracción de proteínas de cultivos celulares, se utilizó el ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (539790, Calbiochem). El uso de este kit, siguiendo las instrucciones del fabricante, permitió la extracción proteica secuencial de diferentes fracciones celulares, en función de su solubilidad. De esta manera, se obtuvieron 4 fracciones proteicas,

### III. Material y Métodos

derivadas de una misma muestra: la fracción 1 contenía las proteínas solubles del citosol, la fracción 2 las proteínas de membrana (de membrana plasmática o de orgánulos), la fracción 3 las proteínas nucleares y la fracción 4, la más insoluble, las proteínas del citoesqueleto. Así se optimizó la recuperación, y posterior detección de proteínas poco abundantes.

En primer lugar, las células en cultivo fueron recogidas y transferidas a un tubo de 50 ml con fondo cónico (2 frascos de 175 cm<sup>2</sup> para una extracción), y se realizaron dos lavados con 20 ml de PBS a 4°C. El botón celular obtenido fue resuspendido en 1ml de *Extraction Buffer I* (solución hipotónica) conteniendo 5µl de *Protease Inhibitor Cocktail*, y transferido a un tubo de 1,5 ml. Tras una incubación de 10 minutos a 4°C en continuo movimiento rotatorio, se centrifugó a 1000 xg durante 10 minutos a 4°C, y se recuperó el sobrenadante, que contenía las proteínas citosólicas (Fracción 1). La muestra restante, fue resuspendida en 1ml de *Extraction Buffer II* (contiene detergentes no iónicos) conteniendo 5µl de *Protease Inhibitor Cocktail*, e incubada durante 30 minutos a 4°C en rotación. Después de una centrifugación a 6000 xg y 4°C, durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante, que contenía proteínas de membrana (Fracción 2). La muestra restante se resuspendió en 0,5ml. *Extraction Buffer III* conteniendo 5µl de *Protease Inhibitor Cocktail* y 1,5µl de *Benzonasa* (acción DNAsa). Después de incubar esta reacción enzimática durante 10 minutos a 4°C en rotación, se centrifugó la muestra a 6800 xg a 4°C durante 10 minutos, tras lo cual se recuperó el sobrenadante, conteniendo las proteínas nucleares (Fracción 3). La muestra restante en el tubo, enriquecida en proteínas insolubles pertenecientes al citoesqueleto, fue resuspendida finalmente en 300 µl de *Extraction Buffer IV* (Fracción 4).

Las tres primeras fracciones contenían las proteínas en su conformación nativa, por lo cual fueron mantenidas en todo momento a 4°C. En cambio, las proteínas de la fracción 4, ya habían sido solubilizadas mediante la acción de detergentes iónicos desnaturizantes (el *Extraction Buffer IV* contiene SDS). La fracción 4 fue mantenida a temperatura ambiente, contribuyendo también así a la solubilización de las proteínas del citoesqueleto.

Para cuantificar la concentración de proteínas en los diferentes extractos se utilizó el método BCA (Bicinchoninic acid, Pierce, 23227). El rango de detección de este sistema es de 20 a 2000 µg/ml. Se utilizó este método de cuantificación porque es compatible con la presencia de SDS en la muestra, y éste forma parte del *Extraction Buffer IV* utilizado en la extracción de proteínas. Se siguió el procedimiento recomendado por el fabricante para muestras pequeñas, en placas de 96 pocillos. La lectura colorimétrica se realizó en un lector de placas de Elisa (Kinetic-QCL, Bio-Whittaker) a una longitud de onda de 562 nm. Se diseñó una curva estándar, con concentraciones conocidas de BSA (23209, Pierce), que permitió inferir la concentración de proteína en las muestras analizadas en cada ensayo.

#### 7.4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Con el objetivo de asegurar la reproducibilidad de los resultados obtenidos, se utilizaron geles de poliacrilamida comerciales del tipo *Nupage Novex 4-12% Bis-Tris Gel* (NP0321, Invitrogen). El gradiente 4-12% de poliacrilamida en estos geles, permite una buena separación de proteínas en un rango de peso molecular mayor de lo que sería posible utilizando geles sin gradiente. Esto era importante en nuestro caso, ya que *a priori* no conocíamos qué rango de peso molecular nos resultaría más informativo.

En todos los casos las muestras fueron desnaturalizadas y reducidas antes de ser aplicadas en el gel. Para ello, al volumen adecuado de muestra (equivalente a 10 µg por pocillo), se añadieron 5 µl de *Nupage LDS Sample Buffer 4X* (NP0007, Invitrogen) y 2 µl de *Nupage Sample Reducing Agent 10X* (NP0004, Invitrogen), y se llevó a un volumen final de 20 µl totales con agua MilliQ. Las muestras, así acondicionadas, fueron calentadas a 95°C durante 3 minutos, para completar la desnaturalización de las proteínas.

En este tipo de electroforesis se utilizaron dos tampones de electroforesis: uno que sólo contenía sales y SDS (dilución 1/20 del *Nupage MOPS SDS Running Buffer 20X*, NP0001, Invitrogen) y que ocupaba la cámara exterior de la cubeta de electroforesis, y otro que además contenía agentes antioxidantes [500 µl de *Nupage Antioxidant* (NP0005, Invitrogen) diluidos en 200 ml de *Running Buffer 1X*] que ocupaba la cámara interior de la cubeta de electroforesis, en contacto directo con el gel y las muestras.

Tras montar el gel en la cubeta de electroforesis *X Cell Surelock Mini-Cell* (EI0001, Invitrogen), se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular (10 µl de *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard*, LC5925, Invitrogen) en los pocillos, y se rellenaron la cámara interior y exterior de la cubeta con los tampones anteriormente descritos. Después de conectar la cubeta a la fuente de voltaje (*Standard Power Pack P25*, 040-800, Biometra), ésta se ajustó a un voltaje constante de 180 V, que se mantuvo durante 50 minutos para completar la separación de las proteínas a lo largo del gel.

#### 7.4.3. Transferencia a membrana de nitrocelulosa

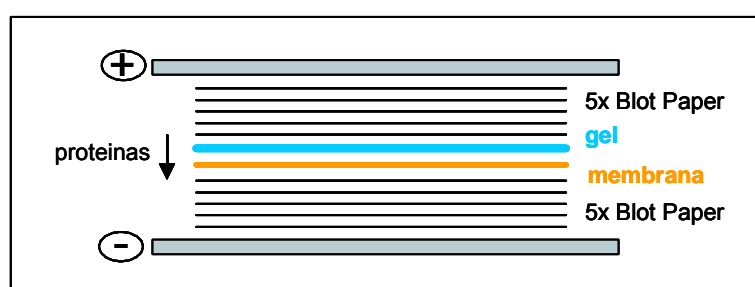
Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, donde quedaban adsorvidas, permitiendo así la posterior inmunodetección sobre la membrana.

La membrana de nitrocelulosa (*Hybond ECL*, RPN 303D, Amersham) recortada al mismo tamaño del gel (7x8 cm), fue prehumedecida en agua destilada, antes de ser equilibrada durante 10 minutos en el tampón de transferencia, compuesto por 10% de metanol y 0,1% de *Nupage*

### III. Material y Métodos

*Antioxidant* (NP0005, Invitrogen) en tampón de transferencia (dilución 1/10 en agua destilada del *Transfer Buffer* 10X, NP0006, Pierce).

El bloque de transferencia se preparó disponiendo el gel de poliacrilamida (después de la electroforesis) sobre la membrana de nitrocelulosa, y todo ello entre dos bloques de papel secante (Blot Papers GB002, 10426693, Schleicher-Schuell, equivalente Whatman 3MM) de 5 capas cada uno, del mismo tamaño que el gel y la membrana, empapados en tampón de transferencia. Tras eliminar las posibles burbujas de aire retenidas entre las capas del bloque de transferencia, éste fue situado entre los dos electrodos del FastBlot B31 (014-800, Whatman-Biometra), quedando el electrodo positivo por encima del gel, y el electrodo negativo por debajo de la membrana (Fig. 18).



**Figura 18.** Esquema del bloque de transferencia.

Antes de conectar el FastBlot se puso en marcha el circuito de refrigeración, conectado al grifo de agua corriente, para evitar el sobrecalentamiento del sistema. Seguidamente, se conectó el FastBlot a la fuente de voltaje (Standard Power Pack P25, 040-800, Biometra), y se ajustó a un amperaje constante de 280 mA, que se mantuvo durante 40 minutos. Durante este tiempo las proteínas fueron atraídas por el electrodo negativo del FastBlot, en la parte inferior, quedando retenidas en la membrana.

Al final de la transferencia, tras desmontar el bloque, se comprobó que la transferencia había sido eficiente, mediante la observación de las bandas correspondientes al marcador de peso molecular (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard) presentes en la superficie de la membrana de nitrocelulosa, y no en el gel de poliacrilamida.

No obstante, para comprobar la correcta transferencia de las proteínas en toda la superficie de la membrana de nitrocelulosa y localizar cada una de las muestras, se realizó una tinción de la membrana con Ponceau S. Con este objetivo, tras la electrotransferencia de proteínas, se incubó la membrana durante 5 minutos en un baño con una solución 0,5 %Ponceau S (3504, Sigma) en 1% ácido acético, a temperatura ambiente. Después se contrastó la tinción con agua destilada durante 2 minutos. Aunque la tinción con Ponceau no es muy sensible (del orden de microgramos de proteína), para esta aplicación ya era suficiente, ya que además no afecta a las

proteínas fijadas sobre la membrana, y es completamente compatible con la posterior inmunodetección.

#### 7.4.4. Detección inmunoquímica

Las membranas, antes de ser incubadas con los anticuerpos, fueron bloqueadas durante dos horas a temperatura ambiente, con un tampón al 2,5% de leche en polvo desnatada (Sveltesse, Nestlé) y 0,1% de Tween 20 (P-7949, Sigma) en PBS, en agitación. Tras esta incubación, el exceso de tampón de bloqueo fue eliminado mediante dos lavados de 1 minuto, seguidos de otros dos de 15 minutos, con PBS.

Para realizar la inmunodetección, los anticuerpos se diluyeron, en todas las ocasiones, en un tampón al 1% de leche desnatada y 0,1% de Tween 20 en PBS. Como anticuerpos primarios, se utilizaron los sobrenadantes de los hibridomas, a una dilución 1/10. Cada muestra (correspondiente a un pocillo del gel de acrilamida) se incubó en 1,5 ml de la dilución del anticuerpo adecuado. Las incubaciones, que se prolongaron durante 16 horas (*overnight*), se realizaron a 4°C con una suave agitación continua. A continuación, para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, se lavaron las membranas con PBS, mediante dos lavados de 1 minuto y otros dos de 15 minutos.

Para cada muestra se preparó 1,5 ml de una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario Goat anti-Mouse Ig marcado con peroxidasa (554002, BD Biosciences), en el mismo tampón descrito para la primera incubación (1% leche desnatada y 0,1% Tween 20 en PBS). Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Después, el exceso de anticuerpo no unido fue eliminado mediante un lavado de 1 minuto, seguido de otros dos de 45 y 15 minutos, respectivamente, con PBS.

Los Western blots fueron revelados mediante quimioluminiscencia. Para preparar la reacción quimioluminiscente (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, 34079, Pierce) se combinaron volúmenes iguales de los reactivos *Stable Peroxide* y *Luminol/Enhancer Solution* (1,5 ml de cada uno para una membrana entera), y se dispensaron uniformemente sobre las membranas, tras eliminar el PBS del último lavado. Después de dejar actuar la reacción durante 5 minutos se descartó el reactivo luminiscente y las membranas fueron colocadas en el cassette de autorradiografía, cubiertas por un film de plástico.

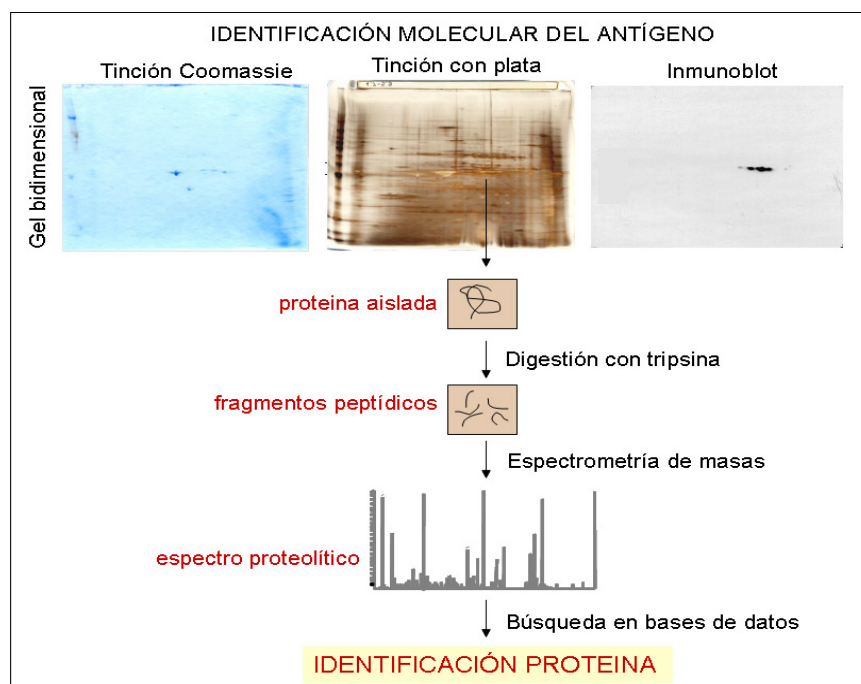
Según las especificaciones del *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, la mayor intensidad en la emisión de luz se obtiene transcurridos 20 minutos desde el inicio de la reacción. En ese momento se expusieron placas de autorradiografía (Hyperfilm ECL, RPN 2103 K, Amersham) durante diferentes tiempos de exposición (1 minuto, 20 segundos, 5 segundos) y posteriormente fueron reveladas utilizando la unidad Kodak M35X-OMAT Processor. Según los

niveles de intensidad obtenidos se hicieron exposiciones más largas, para aumentar la señal, o se esperó una hora para repetir las mismas exposiciones, para disminuir la intensidad.

## 8. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ANTÍGENO

Con la electroforesis en gel de acrilamida descrita en el apartado anterior, las proteínas se separan en función de su peso molecular; así, proteínas con tamaños similares se sitúan en la misma zona del gel y no es posible discriminarlas. Por ello, para poder identificar las proteínas aisladamente, se realizaron electroforesis en geles bidimensionales. Con esta técnica las proteínas se distribuyen en el gel de poliacrilamida en función de su punto isoeléctrico y de su peso molecular. La combinación de estas dos características hace menos probable el solapamiento de dos proteínas en la misma zona del gel.

Mediante técnicas de inmunodetección, el antígeno pudo ser localizado en los geles bidimensionales. Una vez aislado el fragmento del gel de poliacrilamida conteniendo la proteína en cuestión, ésta fue digerida con tripsina. Posteriormente, los fragmentos peptídicos resultantes fueron analizados mediante espectrometría de masas, para poder identificar la proteína (Fig. 19).



**Figura 19.** Esquema general de la estrategia seguida para la identificación molecular del antígeno.



## 8.1. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

### 8.1.1. Preparación de las muestras

Las muestras, para ser correctamente separadas mediante el método de electroforesis bidimensional, era necesario que se encontrasen en un tampón adecuado. Por esta razón se precipitaron en primer lugar los extractos proteicos, para poderlos resuspender posteriormente en el tampón de rehidratación.

En cada caso, se calculó el volumen necesario de muestra que se iba a aplicar en el gel; 50 µg de proteína en el caso de ser detectada posteriormente mediante inmunoblot, y 150 µg si lo que se quería era aislar proteínas e identificarlas a nivel molecular.

Todas las muestras, independientemente del tampón que se hubiese utilizado en su extracción, fueron precipitadas añadiendo 4 volúmenes de acetona fría (a 4°C), y se incubaron durante 1 hora a -20°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El precipitado proteico así obtenido se dejó secar para eliminar los restos de acetona y después cada muestra se resuspendió en 125 µl de tampón de rehidratación. El tampón de rehidratación contenía 7M urea (U6504, Sigma), 2M tio-urea (T8656, Sigma), 4% CHAPS (C9426, Sigma), 65Mm DTT (D9163, Sigma) y *IEF Carrier Ampholytes* (BioRad). Después de resuspender bien la muestra, ésta fue centrifugada de nuevo, para eliminar aquellas proteínas no solubilizadas con este buffer.

La urea, la tio-urea y el CHAPS contribuyen a la solubilización de las proteínas, el DTT funciona como agente reductor y los anfólitos ayudan a la movilidad de las proteínas durante el enfoque isoeléctrico. En cada caso se usó la mezcla de *IEF Carrier Ampholytes* recomendada por el fabricante, dependiendo del rango de pH en que se hiciera el enfoque isoeléctrico.

### 8.1.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque

Para separar las proteínas en función de su punto isoeléctrico, se usaron tiras IPG (Immobilized pH Gradient, BioRad) de 7 cm de longitud, cuyo gel de acrilamida presenta un gradiente de pH; inicialmente se usó un rango amplio de pH (3-10) para poder enfocar todo tipo de proteínas y posteriormente se utilizaron tiras IPG con un rango de pH más restringido, en nuestro caso 4.7-5.9, para separar mejor las proteínas de interés.

Las muestras fueron aplicadas en las tiras IPG mediante rehidratación pasiva; las muestras, como se ha detallado anteriormente, se habían resuspendido previamente en 125 µl de tampón de rehidratación, y esta solución fue utilizada en la rehidratación de las tiras durante toda una noche a 20°C, evitando la evaporación cubriendo las tiras con unas gotas de aceite mineral

### III. Material y Métodos

(163-2129, BioRad). De esta manera las proteínas de las muestras fueron también, a su vez, absorbidas en el gel.

En la bandeja de isoelectroenfoque, se colocaron dos trocitos de papel de filtro (3x5 mm) humedecidos con agua MiliQ, uno sobre cada electrodo y, sobre éstos, sendos extremos de las tiras IPG previamente rehidratadas. Esto ayuda a eliminar posibles interferencias en el proceso de isoelectroenfoque causadas por un exceso de sales en la muestra.

Tras cubrir las tiras con aceite mineral, se posicionó la bandeja de isoelectroenfoque dentro de la fuente de voltaje Protean IEF Cell (BioRad, 165-4000) y se procedió a realizar el enfoque isoeléctrico de las muestras, siguiendo el programa recomendado por el fabricante, según el tipo de tira IPG, según se indica en la tabla 12.

Una vez acabado el proceso de isoelectroenfoque las tiras fueron recuperadas y conservadas a -20°C, hasta el momento de proceder con la electroforesis en gel de poliacrilamida.

**Tabla 12.** Condiciones de isoelectroenfoque para los diferentes tipos de tira IPG utilizadas.

Pasos	V Inicial	V Final	Duración	Rampa	Temperatura
Condiciones de enfoque para tiras pH 3-10					
Paso 1	0 V	4.000 V	8-10.000 V-hr	Rápida	20°C
Condiciones de enfoque para tiras pH 4,7-5,9					
Paso 1	0 V	250 V	15 min.	Rápida	20°C
Paso 2	250 V	4.000 V	1 hora	Lenta	20°C
Paso 3	4.000 V	4.000 V	10-20.000 V-hr	Rápida	20°C

#### 8.1.3. Segunda dimensión: SDS-PAGE

Antes de iniciar la electroforesis en el gel de poliacrilamida (separación de las proteínas en función del peso molecular), las tiras IPG fueron equilibradas durante 10 minutos en agitación con Tampón SDS, compuesto por 6M Urea y *Sample Reducing Agent* 1X (NP0004, Invitrogen) en *LDS Sample Buffer* 1X (NP0007, Invitrogen). Posteriormente, las tiras fueron nuevamente incubadas en Tampón Iodoacetamida, consistente en 6M Urea y 2,5% iodoacetamida en *LDS Sample Buffer* 1X, durante otros 10 minutos. Este paso de equilibrado confirió a las proteínas la conformación lineal adecuada y la carga negativa necesaria para la electroforesis.

Tras el acondicionamiento de las tiras IPG, se descartó el exceso de tampón y se situaron las tiras en posición horizontal en el fondo del pocillo adecuado (7 cm de longitud) de geles Nupage 4-12% Bis-Tris ZOOM Gel (NP0330, Invitrogen). Tras sellar el pocillo con 250 µl de

agarosa al 1%, se siguió con el protocolo de electroforesis en gel de poliacrilamida, tal como se describe en la sección III.7.4.2.

Una vez separadas las proteínas en el gel bidimensional, éstas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa. Mientras se realizaba el proceso de inmunodetección, descrito en el apartado III.7.4.4., se llevó a cabo la tinción de los geles (tras haber sido transferidos) con Azul de Coomassie. Como la sensibilidad del reactivo utilizado (GelCode Blue Stain Reagent, 24590, Invitrogen) es del orden de 10 ng, era posible detectar las proteínas mayoritarias en el gel, incluso después de la transferencia. Con este objetivo, los geles, ya transferidos, fueron incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente, en un baño con 50 ml de tampón de fijación (50% metanol + 7% ácido acético en agua destilada). Después de lavar los geles durante 10 minutos con agua destilada, fueron teñidos durante 1 hora, con 20 ml de GelCode Blue Stain Reagent (24590, Invitrogen), en un baño en agitación, también a temperatura ambiente. Finalmente, la tinción fue contrastada con agua destilada durante 1 hora. De esta manera, fue posible contrastar las imágenes obtenidas mediante inmunoblot y tinción con Azul de Coomassie, de un mismo gel bidimensional, para localizar la mancha correspondiente al antígeno reconocido por los anticuerpos monoclonales utilizados.

## 8.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Para poder identificar las proteínas, los geles bidimensionales de poliacrilamida fueron teñidos con plata, y se recortaron las manchas correspondientes a las proteínas de interés. Tras digestión con tripsina de las muestras, los fragmentos peptídicos resultantes fueron analizados mediante espectrometría de masas (Fig. 19).

### 8.2.1. Tinción con plata de geles de poliacrilamida

La tinción con plata (SilverQuest Silver Staining Kit, LC6070, Invitrogen) de las proteínas en geles de poliacrilamida, es compatible con el posterior análisis de las mismas, mediante espectrometría de masas.

Todas las soluciones necesarias para esta tinción se prepararon utilizando agua MiliQ. Ya que la tinción con plata es altamente sensible ( $\geq 0,3$  ng de proteína), cualquier pequeña contaminación podría alterar los resultados.

Tras la electroforesis, los geles fueron lavados brevemente en agua MiliQ, antes de ser incubados en una solución de fijación (40% etanol + 10% ácido acético) durante 20 minutos en agitación. Después, se eliminaron los restos de esta solución con un lavado de 10 minutos en etanol al 30%. Posteriormente, los geles fueron incubados durante 10 minutos en la solución de sensibilización (30% etanol + 10% *Sensitizer*), seguida de dos lavados de 10 minutos con etanol al 30% y agua MiliQ, respectivamente. Seguidamente, los geles fueron incubados durante 15

### III. Material y Métodos

minutos con la solución de tinción (1% *Stainer*) y, después de un lavado de 30 segundos en agua MiliQ, se procedió al revelado de los geles, en solución de revelado (10% *Developer* + 1 gota *Developer Enhancer*), mediante una incubación de 7 minutos. Una vez obtenida la intensidad deseada de la tinción de proteínas, se añadió 5 ml del reactivo *Stopper* y se dejó en agitación durante 10 minutos. Finalmente, los geles se lavaron con agua MiliQ durante 10 minutos.

#### 8.2.2. Digestión con tripsina

Las manchas correspondientes a proteínas de interés fueron recortadas de geles bidimensionales teñidos con plata, en una campana de flujo laminar, utilizando un bisturí. Las muestras fueron desteñidas, deshidratadas y posteriormente digeridas con tripsina, utilizando el *Montage In-Gel DigestZP Kit* (LSKG DZP 96). Las piezas de gel se lavaron con 100  $\mu$ l de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM (en 50% etanol) durante 20 minutos a temperatura ambiente, y luego fueron deshidratadas con etanol absoluto durante 15 minutos. Las proteínas del gel fueron reducidas químicamente mediante la adición de 200  $\mu$ l de DTT 10mM e incubando durante 1 hora a 56°C. Posteriormente, las cisteínas reducidas fueron carbamidometiladas mediante una incubación, de 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, en 200  $\mu$ l de iodoacetamida 55mM. Tras lavar los geles con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM durante 15 minutos, las muestras fueron deshidratadas mediante tres incubaciones consecutivas de 30 minutos en 100  $\mu$ l de acetonitrilo al 50% y 25 mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , y una incubación final de 10 minutos en acetonitrilo 100%. Para la digestión, se añadieron 166 ng de tripsina por muestra y, tras cubrir el gel con el volumen necesario de tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM, se incubó toda la noche a 37°C. Tras la posterior activación de la resina de las placas con 8  $\mu$ l de acetonitrilo 100%, los péptidos fueron extraídos del gel mediante tres lavados con la solución de extracción (0,2% TFA). Finalmente, los péptidos fueron eluidos de la placa mediante la adición de una solución 0,1% TFA + 50% acetonitrilo, y recogidos directamente en una placa recolectora.

Este protocolo, al igual que el posterior análisis mediante espectrometría de masas fue llevado a cabo en la Plataforma de Proteómica de la Facultad de Medicina - Hospital Clínic de la Universidad de Barcelona.

#### 8.2.3. Análisis de los fragmentos peptídicos mediante espectrometría de masas

Los fragmentos peptídicos resultantes, tras ser eluidos de las placas ZipPlate, fueron secados y resuspendidos en 0,1% TFA. Se mezcló medio microlitro de esta suspensión con el mismo volumen de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hydroxicinámico (3 mg/ml), y se analizó mediante espectrometría de masas (MALDI-ToF Voyager DE Pro, Applied Biosystems). Con los resultados acumulados de 100 disparos de láser se generaron los perfiles proteolíticos de las muestras. Estos espectros fueron tratados realizando un deisotopado de los picos para generar un listado de valores correspondientes a los iones monoisotópicos de cada péptido detectado. Éstos fueron

analizados con el programa MSFit Protein Prospector (v.3.2.1), teniendo en cuenta la oxidación de las metioninas, la formación de piroglutámico y la posible acetilación del extremo N-terminal, así como la consideración de las cisteínas en la forma carbaminometilada. La máxima diferencia de masa peptídica tolerada fue de 50.000 ppm, y sólo una diana de digestión omitida.

Para la identificación de proteínas a partir de los espectros de fragmentación, se utilizó la base de datos SwissProt, restringiendo la búsqueda a proteínas de origen murino.

Para la interpretación final de los resultados obtenidos en las búsquedas en las bases de datos, el programa utilizaba el algoritmo MOWSE, en base a la cantidad y abundancia relativa de los péptidos identificados. De esta manera se obtuvo la probabilidad asociada a cada una de las proteínas identificadas (MOWSE Score). Siguiendo esta metodología, la identificación de una proteína puede ser considerada fiable cuando el Score es  $\geq 1 \times 10^3$ , habiéndole asignado al menos 3 péptidos.

## **9. EXPRESIÓN ECTÓPICA DE PERIFERINA**

Para comprobar el reconocimiento específico de la periferina, por parte de los hibridomas estudiados, y analizar posibles patrones de reconocimiento diferenciales frente a las diferentes isoformas, se realizaron transfecciones transitorias de los plásmidos correspondientes a las 3 isoformas de la periferina.

### **9.1. CÉLULAS**

En las transfecciones se utilizó la línea celular de SW13 vim- (carcinoma adrenal humano, derivada de ATCC#CCL-105 mediante subclonación, cedida por la Dra. J. Robertson), que no expresa vimentina, y por lo tanto carece de estructura propia de filamentos intermedios.

Esta línea celular fue testada para Mycoplasma y mantenida en cultivo, tal como se ha descrito en la sección III.6.2 para el resto de líneas celulares.

### **9.2. VECTORES**

Los plásmidos Per61, Per58 y Per56 contienen el cDNA correspondiente a las diferentes isoformas de la periferina, clonados en la diana para Not1 del vector pRcCMV, bajo un promotor de expresión constitutiva en células de mamífero. Estos plásmidos, previamente descritos [Robertson et al., 2003], fueron cedidos por la Dra. J. Robertson (Centre for Research in Neurodegenerative Diseases, university of Toronto).

#### 9.3. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA CON LIPOFECTAMINA

Para la transfección de los diferentes vectores, en cultivos celulares de la línea SW13 vim(-), se utilizó Lipofectamine™ 2000 (11668-27, Invitrogen). Este reactivo de naturaleza lipídica, al mezclarse con el DNA, forma complejos de tipo liposoma, con capacidad para fusionarse con la membrana plasmática de las células. Cuando esto sucede, el DNA es liberado hacia el interior de las células, donde se mantiene en forma episómica. Al no ser un método que implique la integración del DNA transfectado en el genoma de las células, los plásmidos permanecen funcionales sólo de forma temporal.

Las transfecciones se llevaron a cabo sobre cultivos en placas de 6 pocillos (área=10 cm<sup>2</sup>), en los que la confluencia era de al menos un 90%. Para cada pocillo se preparó una solución de 4 µg de DNA plasmídico en 250 µl de medio de transfección (RPMI 1640 + L-glutamina 2mM, sin FBS ni antibióticos) y una solución de 10 µl de Lipofectamina en 250 µl de medio de transfección. Estas dos soluciones fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente, para favorecer su estabilización. Después se mezclaron ambas soluciones, agitando suavemente, y se incubó la mezcla durante 20 minutos a temperatura ambiente, permitiendo así la formación de liposomas. Mientras tanto, se retiró el medio de cultivo completo de los cultivos, y se sustituyó por 2 ml de medio de transfección, en cada uno de los pocillos. Tras la incubación se añadió a cada pocillo la mezcla correspondiente de DNA con lipofectamina y se agitó con suavidad. Después de una incubación de 5 horas y media a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, el medio fue sustituido por 2 ml medio de cultivo completo.

Era importante que en el momento de hacer la transfección el cultivo celular tuviera una confluencia igual o superior al 90%, para minimizar el efecto tóxico de la propia lipofectamina. a causa de esta alta densidad celular inicial, a las 24 horas los cultivos ya eran totalmente confluentes, así que fueron tripsinizados y pasados a frascos de cultivo (área=75 cm<sup>2</sup>), a razón de 3 pocillos por frasco, en 10 ml de MCC. De esta manera, se consiguió mejorar la viabilidad del cultivo.

A las 48 horas, desde el inicio de la transfección, las células transfectadas fueron recogidas para la extracción de proteínas y posterior análisis mediante Western blot (sección III.7.4.). Para confirmar mediante Western blot el éxito de la transfección y producción celular de las diferentes isoformas de periferina, se utilizaron los anticuerpos policlonales descritos en la tabla 13.

**Tabla 13.** Anticuerpos policlonales utilizados para la detección de periferina mediante Western blot.

<b>ANTICUERPO PRIMARIO</b>	<b>ANTICUERPO SECUNDARIO</b>
Rabbit anti-Peripherin (PRB-566C, Covance) dilución 1/10000	HRP-conjugated Donkey anti-Rabbit Ig (31458, Pierce) dilución 1/9000
Goat anti-Peripherin (SC-7604, Santa Cruz Biotechnology) dilución 1/200	HRP-conjugated Donkey anti-Goat IgG (705-036-147, Jackson ImmunoResearch) dilución 1/100.000

## **ANEXO 1. Test para la detección de *Mycoplasma***

*Mycoplasma* es un tipo de bacteria que produce contaminaciones crónicas en los cultivos celulares, aunque a menudo pasan desapercibidas, ya que al tratarse de una infección intracelular no resulta visible al revisar los cultivos con el microscopio; se caracteriza por una disminución en el metabolismo celular, así como en su tasa de actividad y crecimiento celular. Es por tanto un factor que puede afectar gravemente a la calidad de los resultados obtenidos, si se realizan ensayos utilizando cultivos celulares contaminados.

Por esta razón todas las líneas celulares fueron testadas para *Mycoplasma*, antes de ser utilizadas en los diferentes ensayos descritos en esta memoria. En cada caso, al tercer día después de haber iniciado el cultivo, se realizó un test para detectar contaminación por *Mycoplasma*, mediante PCR de una muestra de sobrenadante del cultivo.

Para la reacción de PCR para detectar *Mycoplasma* se utilizó la pareja de primers MICO-1 (5'-GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG-3') y MICO-2 (5'-CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G-3'), específicos para una secuencia del 16S rRNA común en las especies más comunes de *Mycoplasma*. Así, cuando hay presencia de *Mycoplasma* en la muestra, la PCR da como resultado un amplíero de 0,5 kb.

La mezcla de reacción de amplificación (volumen total de 20 µl) se preparó siguiendo las siguientes proporciones:

- 7,8 µl de agua destilada autoclavada
- 2 µl de Buffer 10X (MgCl<sub>2</sub> free, 20.035, Biotools)
- 2 µl de dNTPs 2 mM (20.031, Biotools)
- 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 15 mM (20.036, Biotools)
- 2 µl de Primer Sense MICO-1 5 µM
- 2 µl de Primer Antisense MICO-2 5 µM
- 0,2 µl de DNA Polimerasa (1 U/µl, 10.011, Biotools)
- 2 µl de muestra de sobrenadante de cultivo

La reacción de PCR se realizó en el termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems), mediante 30 ciclos de amplificación, a una temperatura de hibridación de 55°C.

Aquellos cultivos que dieron resultado positivo en este test, fueron tratados con 10 µg/ml de Ciprofloxacino (610451, Lab. Normon) durante 14 días, antes de repetir el test de *Mycoplasma* por PCR para confirmar su completa descontaminación.





## **IV. RESULTADOS / 1**

### **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS B INFILTRANTES EN ISLOTES PANCREÁTICOS**



Estudios previos indican que los linfocitos B podrían tener un papel fundamental en el desarrollo de la diabetes tipo 1. Sin embargo, las conclusiones son contradictorias, ya que según el modelo experimental estudiado, los datos obtenidos sugieren un papel promotor o inhibidor de la respuesta autoinmunitaria dirigida hacia las células beta pancreáticas. Estos datos contradictorios pueden ser indicativos de estados funcionales determinantes de diferentes acciones de los linfocitos B, en diferentes fases de la enfermedad o en distintas localizaciones anatómicas.

La mayoría de los datos, conocidos hasta el momento, sobre la función de los linfocitos B en el desarrollo de la T1D, provienen del estudio de variantes transgénicas, variantes deficientes o ensayos de transferencia sobre el modelo animal NOD, en los que la población global de linfocitos B se ve alterada por el ensayo experimental. Recientemente, algunos autores han centrado sus estudios en la capacidad presentadora de los linfocitos B en los propios ganglios linfáticos pancreáticos. No obstante, pocos estudios, hasta el momento, habían sido focalizados hacia la población de linfocitos B que forma parte del infiltrado que invade los islotes pancreáticos durante el desarrollo de la diabetes.

En este capítulo se describen los resultados de la caracterización, fenotípica y funcional, de la población de linfocitos B que infiltra los islotes pancreáticos, evaluando sus diferencias respecto a la población periférica de linfocitos B.

## **1. SEGUIMIENTO DE LA EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS B INFILTRANTES EN ISLOTES**

Como primer paso en la caracterización de la población de linfocitos B que infiltran los islotes pancreáticos durante el desarrollo de la T1D, se consideró relevante conocer su evolución, así como su distribución, a lo largo de las diferentes etapas de la enfermedad.

### **1.1. DISTRIBUCIÓN DE LOS LINFOCITOS B**

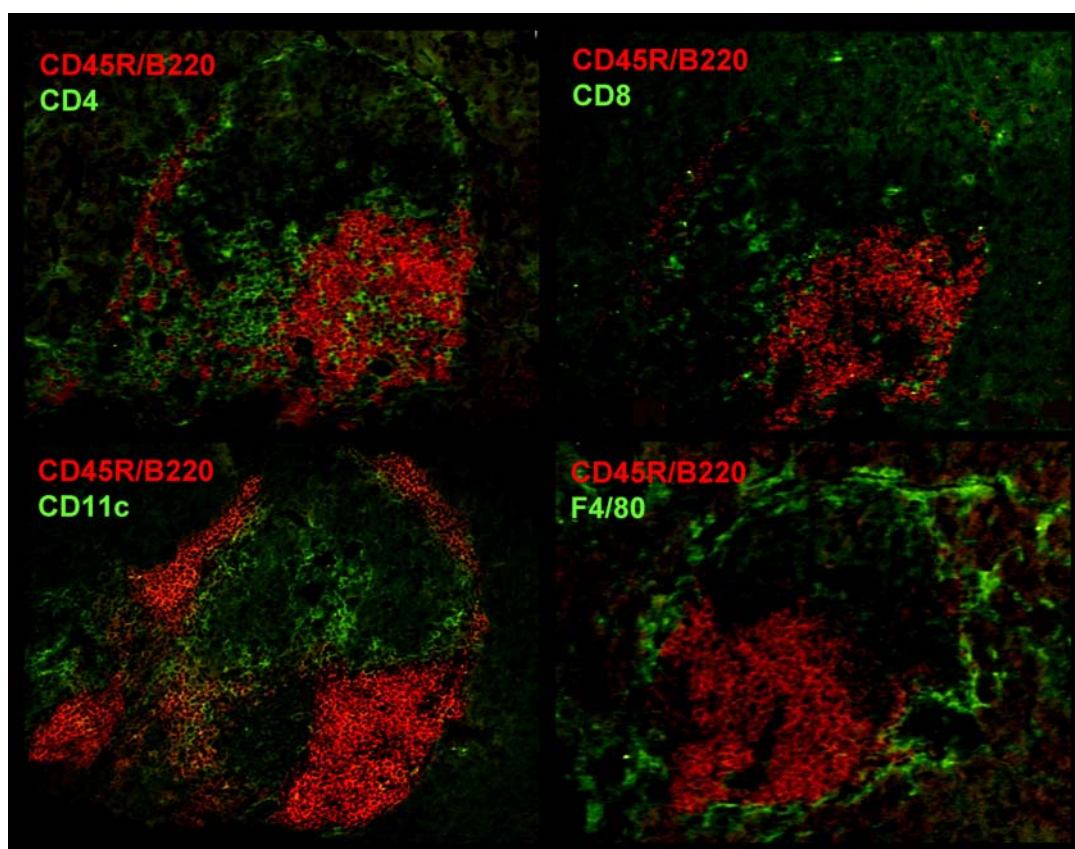
Como primer paso en la caracterización de los linfocitos B infiltrantes, a lo largo de la evolución de la diabetes, se realizaron tinciones dobles, mediante inmunofluorescencia, para conocer la distribución de los linfocitos B (CD45R/B220+) respecto a otras poblaciones celulares también importantes [linfocitos T (CD4+ y CD8+), células dendríticas (CD11c+) y macrófagos (F4/80+)], dentro del infiltrado de los islotes pancreáticos.

El análisis histológico se realizó sobre criosecciones de páncreas, procedentes de hembras NOD de 5, 7, 9 y 12 semanas de edad, así como de hembras diabéticas de reciente debut clínico y hembras adultas no diabéticas (consideradas resistentes al llegar a las 32 semanas de edad).

En las muestras histológicas procedentes de animales de 5 y 7 semanas de vida, la insulinitis se encuentra en un estado inicial: es frecuente encontrar aún islotes libres de infiltrado y en aquellos en los que sí se observa insulinitis, ésta se encuentra en etapas incipientes (peri-insular y leve). En estas primeras etapas de la enfermedad, se ha encontrado una especial abundancia de macrófagos en el tejido pancreático, que se hallan distribuidos por todo el tejido exocrino pero también, y especialmente, en el interior de los islotes pancreáticos. También especialmente distribuidas en la zona endocrina, se localizan las células dendríticas. En los islotes en los que sólo se detecta un infiltrado muy inicial, la primera población de tipo linfoide que hemos identificado son linfocitos T de tipo CD4+, más adelante, cuando aumenta el número de células infiltrantes aparecen ya linfocitos B y T CD8+.

En etapas más avanzadas de la diabetes (animales a partir de 9 semanas de vida) el nivel de infiltración de los islotes pancreáticos es mayor: son abundantes los islotes que presentan insulinitis moderada (25-50% de ocupación) e incluso severa (>50% del islote ocupado por la masa de células infiltrantes), especialmente en el caso de los animales de 12 semanas. Curiosamente, en las hembras de 32 semanas no diabéticas, las cuales consideramos resistentes, el grado de insulinitis es menor que el observado a las 12 semanas. En los cortes procedentes de animales diabéticos el número de islotes se encuentra claramente reducido, ya que la masa de células beta ya ha sido destruida en gran parte, sin embargo los islotes que aún son detectables presentan en su mayoría un infiltrado de grado severo. En el análisis histológico de los islotes con insulinitis moderada y severa (Fig. 20), se ha observado que la mayor parte de la masa de células infiltrantes corresponde a células T del tipo CD4+, distribuyéndose homogéneamente por todo el infiltrado, pero especialmente en el frente de avance del mismo. Los linfocitos B, aunque también en número considerable, se distribuyen de forma dispersa por el infiltrado pero siendo menos abundantes en el frente del mismo, dominado mayoritariamente por los linfocitos T CD4+. En el caso de los linfocitos T CD8+, mucho menos abundantes, se encuentran repartidos por todo el infiltrado, sin presentar una zonalidad distintiva. En estos estadios de la insulinitis los macrófagos, aunque ya no tan abundantes como en las fases previas, muestran una distribución peri-insular, rodeando los islotes pancreáticos. Mientras, las células dendríticas, de forma similar a los linfocitos T CD4+, se distribuyen preferencialmente en la zona de avance del infiltrado, e incluso entre la masa de células endocrinas que aún se conserva.

En conjunto, la masa de células infiltrantes que invade los islotes, se ha visto que está constituida mayoritariamente por linfocitos T (sobretudo CD4+), linfocitos B y células dendríticas. La distribución dispersa que presentan los linfocitos T y B, dentro del infiltrado, podría permitir el contacto directo entre ellos.



**Figura 20.** Tinciones dobles obtenidas mediante inmunofluorescencia, mostrando la distribución, en el tejido pancreático, de los diferentes tipos celulares que conforman el infiltrado mononuclear en los islotes de Langerhans. Las criosecciones corresponden a una hembra NOD de 12 semanas de edad. Se muestra un islote pancreático con insulitis moderada (el infiltrado ocupa entre 25-50% del islote). Marcados en verde (FITC) se pueden localizar los linfocitos T CD4+, CD8+, las células dendríticas (CD11c+) y los macrófagos (F4/80+), respectivamente. En todas las secciones, los linfocitos B (CD45R/B220+) se encuentran marcados en rojo (rodamina). (x200)

## 1.2. PROPORCIÓN DE LINFOCITOS B

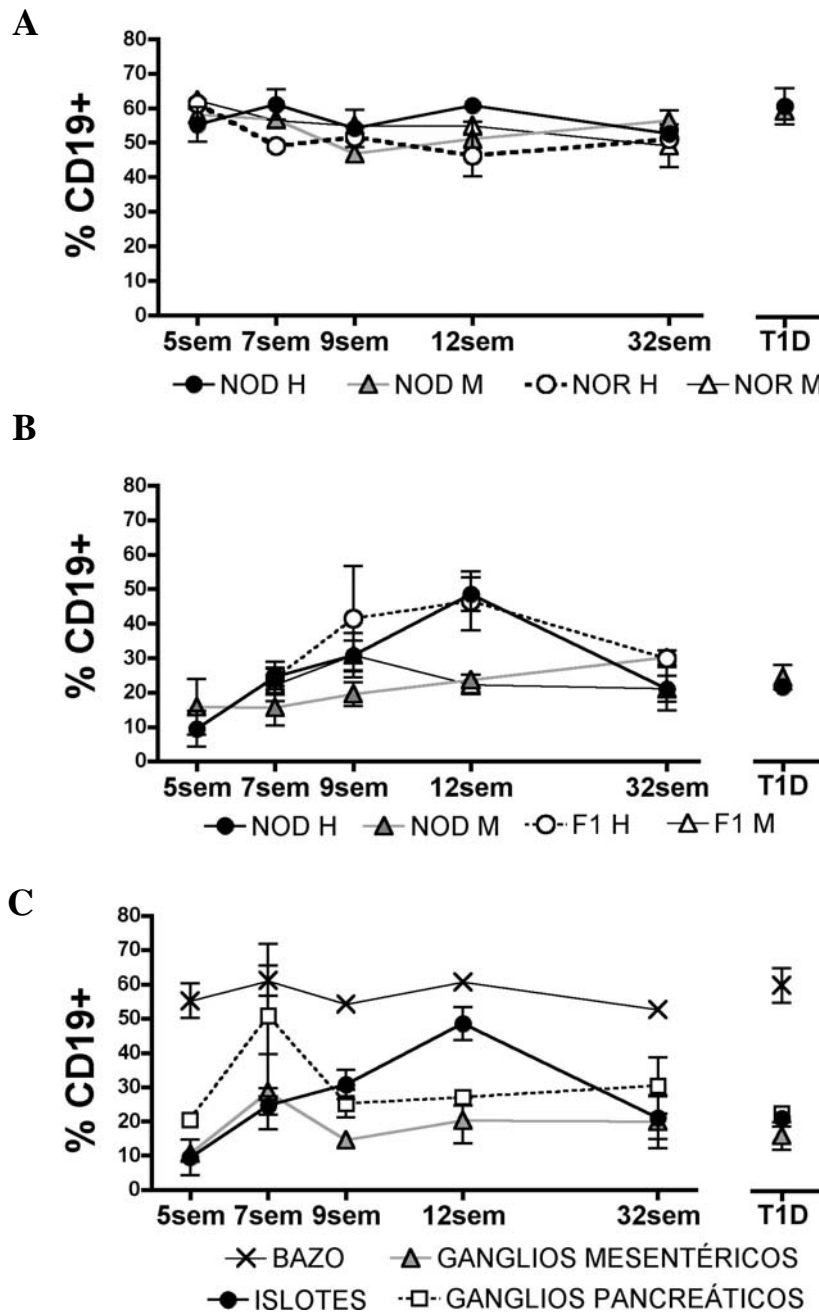
Para seguir la evolución de la población de linfocitos B infiltrantes en los islotes, de forma cuantitativa, ésta fue analizada mediante citometría de flujo. Con este objetivo, tras la digestión del páncreas con colagenasa y la purificación de los islotes, se midió el porcentaje de células B (CD19+) en la población de linfocitos infiltrantes. Como referencia, se analizaron también otras poblaciones linfocitarias periféricas, procedentes de órganos linfoides secundarios: bazo, ganglios linfáticos mesentéricos y ganglios linfáticos pancreáticos.

En este caso, se realizó un análisis comparativo de animales NOD correspondientes a 6 diferentes grupos de edad: 5, 7, 9, y 12 semanas de vida, adultos no diabéticos (considerados resistentes a las 32 semanas de vida) y adultos diabéticos de reciente debut clínico. Se

analizaron al menos 3 animales por grupo y sexo. Para comparar los resultados obtenidos en bazo y ganglios linfáticos, se tomaron muestras de animales NOR, de los mismos grupos de edad, como controles correspondientes a animales resistentes. Puesto que los islotes pancreáticos de animales NOR sólo se ven afectados por una ligera peri-insulitis, se tomaron muestras de páncreas de animales F1(NOD X NOR), como controles resistentes a la diabetes pero con insulitis “benigna”. Cabe señalar que no fue posible analizar el infiltrado pancreático de ratones F1 de 5 semanas de edad, ya que en estos animales la aparición de la insulitis se presenta de forma retardada en comparación con los NOD, de manera que a esta edad no se encuentra cantidad suficiente de células infiltrantes para realizar el análisis citométrico. Asimismo, en esta cepa tampoco se estudió el grupo de animales diabéticos, ya que la aparición clínica de la enfermedad en individuos F1 es poco habitual.

Se ha observado una destacada variabilidad en el porcentaje de células B (CD19+), dentro de la población total de linfocitos, en los diferentes órganos estudiados (Fig. 21). En el caso del bazo, el porcentaje de células B se mantiene constante a lo largo de la vida, tanto en animales NOD como en los controles, correspondiendo a un 50-60% del total de linfocitos de la muestra (Fig. 21-A). En ganglios linfáticos, los resultados presentan gran variabilidad, tanto en las diferentes edades y cepas, como incluso dentro de cada grupo. Curiosamente, la proporción de linfocitos B dentro del infiltrado pancreático sufre un cambio significativo a lo largo de la evolución de la diabetes: al inicio de la insulitis la población de linfocitos B dentro del infiltrado es escasa, representando sólo un 10-20% del total de la población de linfocitos, pero este porcentaje se ve incrementado a medida que pasan las semanas y el grado de insulitis es mayor, especialmente en hembras (tanto las correspondientes a la cepa NOD como las NOR), de manera que a las 12 semanas se detectan más de un 40% de linfocitos B (Fig. 21-b). Este momento, justo antes de la aparición de los primeros casos de diabetes clínica en animales NOD, parece ser un punto de inflexión, ya que tanto en animales diabéticos como en animales adultos no diabéticos el porcentaje de células B vuelve a ser menor, alrededor del 20%, quizá debido a una expansión relativa o migración preferencial por parte de linfocitos T. Este perfil de evolución de la proporción de linfocitos B, dentro del infiltrado, no se puede interpretar como un reflejo de lo que pasa en los ganglios linfáticos, ya en estos órganos la proporción de linfocitos B no presenta ningún incremento paralelo entorno a las 12 semanas de edad (Fig. 21-C).

De esta manera, la población de linfocitos B, que al inicio de la insulitis es poco abundante, podría tener un papel más relevante alrededor de las 12 semanas de vida en estos animales, y especialmente en las hembras. Ya que la evolución de la población de linfocitos B infiltrantes evoluciona de forma similar en las cepas NOD y F1(NODxNOR), parece que el aumento en la abundancia de linfocitos B en la etapa pre-diabética en las hembras, aún estar posiblemente relacionada con la susceptibilidad al desarrollo de la diabetes, no parece ser un factor determinante en la aparición final de la enfermedad.



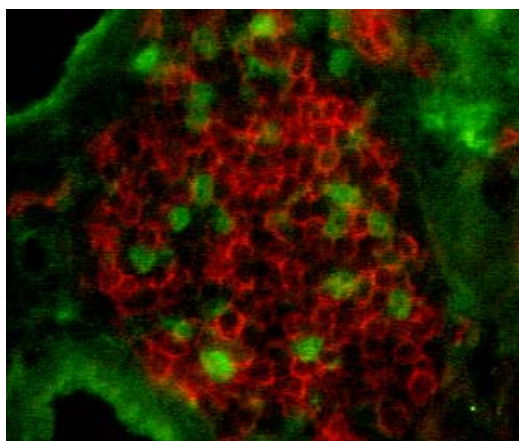
**Figura 21.** Seguimiento, mediante citometría de flujo, de la evolución de la población de linfocitos B. Porcentaje de linfocitos B a diferentes edades (5, 7, 9, 12 semanas, adultos no diabéticos de 32 semanas de edad, y animales diabéticos de reciente debut). En cada punto se muestra la media y error estándar, representativos de un mínimo de 3 animales. **A.** Porcentaje de linfocitos B en la población linfocitaria esplénica en machos y hembras de las cepas NOD y NOR. **B.** Porcentaje de linfocitos B en el infiltrado linfocitario de islotes pancreáticos, en machos y hembras NOD y F1(NODxNOR). **C.** Figura comparativa del porcentaje de linfocitos B en las poblaciones linfocitarias procedentes de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios linfáticos pancreáticos e infiltrado pancreático, de hembras NOD.

H=hembras, M=machos

### 1.3. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS B “IN SITU”

Puesto que en el infiltrado pancreático se había observado un incremento en la proporción de linfocitos B, especialmente en hembras de 12 semanas de edad, se estudió la posibilidad de que estas células estuviesen proliferando “in situ”, dentro del propio islote. Con este objetivo, se realizaron tinciones dobles, mediante técnicas de inmunofluorescencia, sobre criosecciones de páncreas de hembras NOD de 12 semanas de edad. El anticuerpo anti-Ki67 se utilizó para detectar, dentro de los islotes, células en división, ya que se une de forma específica a esta proteína nuclear que se expresa durante las fases G1 tardía, S, M y G2 del ciclo celular. Sobre los mismos cortes, se localizaron los linfocitos B mediante un anticuerpo anti-CD45R/B220.

Los resultados obtenidos mostraron que es detectable un cierto grado de proliferación celular, dentro de los islotes; tanto en la zona endocrina como en la ocupada por células infiltrantes. Sin embargo, esta proliferación corresponde a otros tipos celulares, puesto que rara vez fueron positivos para Ki67 los núcleos de linfocitos B (Fig. 22).



**Figura 22.** Tinción doble obtenida mediante inmunofluorescencia sobre una criosección de páncreas mostrando una porción de infiltrado pancreático. Con rodamina, emitiendo fluorescencia en rojo, se localizaron los linfocitos B (CD45R/B220+), mientras que con fluoresceína, en verde, se marcaron los núcleos de células en división (Ki67+). En este caso, puede apreciarse que los núcleos marcados en verde no corresponden a linfocitos B. (x400)

Teniendo en cuenta que, dentro del infiltrado intransular, los linfocitos B no se distribuyen formando agrupaciones claras, y que además no fue posible detectar proliferación de este tipo celular dentro del propio infiltrado, resulta altamente probable que los cambios evolutivos observados en la proporción de linfocitos B se deban a variaciones en el patrón de migración preferencial de linfocitos T/B a lo largo de la progresión de la insulinitis.



#### 1.4. EXPRESIÓN DEL BCR Y LA MOLÉCULA CD19 DEL COMPLEJO CORRECEPTOR

Como se ha descrito anteriormente, el marcaje para el antígeno de superficie CD19 se utilizó como identificador específico de la población de linfocitos B, en el análisis mediante citometría de flujo.

Sorprendentemente, al analizar las distintas poblaciones de linfocitos B, se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de CD19 en las diferentes localizaciones anatómicas estudiadas (Fig. 23). Mientras que los niveles de expresión de CD19 se mantienen más o menos constantes a lo largo del tiempo tanto en muestras de bazo como de ganglios linfáticos, siendo además similar en todos ellos, en los linfocitos B infiltrantes de islotes se observó una disminución significativa en la expresión de CD19, a medida que avanza la insulinitis. Esta diferencia no es tan evidente en las fases iniciales de la insulinitis, donde el nivel de expresión de CD19 en células B infiltrantes es en algunos casos similar al encontrado en otros órganos del mismo individuo. En cambio, sí es especialmente significativa a partir de las 9 semanas de vida, momento en el cual se ha observado una reducción de un 60% en la expresión de CD19, respecto a los niveles detectados en los órganos linfoides secundarios. Tanto en el caso de animales NOD como en los resistentes F1(NOD X NOR), se ha observado esta disminución de CD19, a niveles similares, sin mostrar diferencias aparentes entre sexos.

Asimismo, también se observó un efecto similar en la expresión de IgD: la expresión de IgD en la superficie de los linfocitos B infiltrantes, en los individuos más jóvenes de la cepa NOD (5-7 semanas) presenta una amplia variabilidad, siendo en ocasiones similar a la observada en los linfocitos B esplénicos de los mismos animales, pero a medida que avanza la edad se hace evidente que los niveles de expresión de IgD se ven disminuidos en los linfocitos B infiltrantes, contrariamente a lo que se observa en linfocitos B de bazo (Fig. 24-A y B). De nuevo, este efecto es exclusivo del infiltrado pancreático, y no se ve reflejado, de manera similar en otras poblaciones linfocitarias periféricas como las de ganglios linfáticos (Fig. 24-C). Esta baja expresión de IgD en la membrana celular es también detectable, en la misma medida, en los individuos de la cepa F1(NODxNOR), con insulinitis benigna.

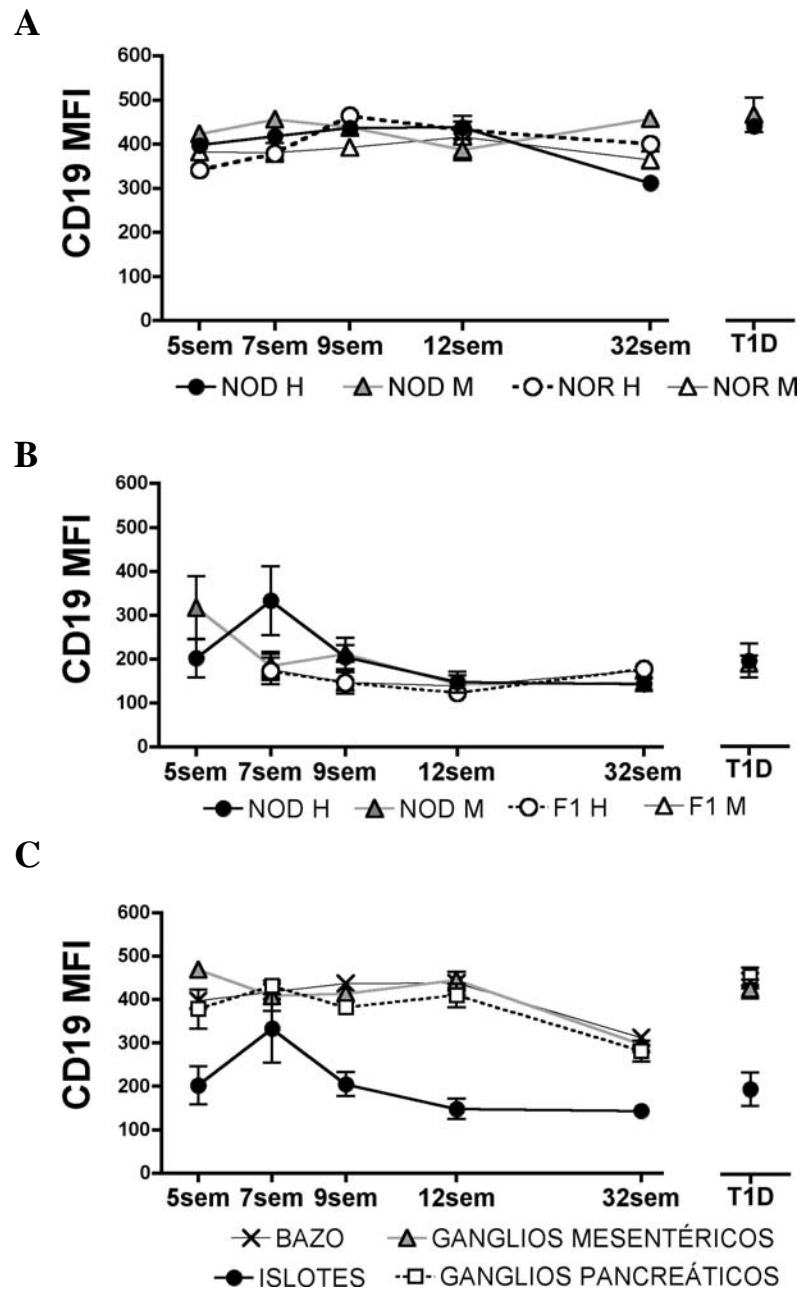


Figura 23. Análisis cuantitativo, mediante citometría de flujo, de la variabilidad en los niveles de expresión de la molécula CD19 en la superficie de los linfocitos B, en función de la cepa, sexo, edad y órgano estudiado. Se representa la mediana de la intensidad de fluorescencia en la población de linfocitos B. En cada punto se muestra la media y error estándar, representativos de al menos 3 animales. A. Expresión de CD19 en linfocitos B esplénicos de machos y hembras de las cepas NOD y NOR. B. Nivel de expresión en superficie de CD19 en linfocitos B infiltrantes de islotes pancreáticos, en machos y hembras NOD y F1(NODxNOR). C. Figura comparativa del nivel de expresión de CD19 en linfocitos B en las poblaciones linfocitarias procedentes de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios linfáticos pancreáticos e infiltrado pancreático, de hembras NOD. H=hembras, M=machos

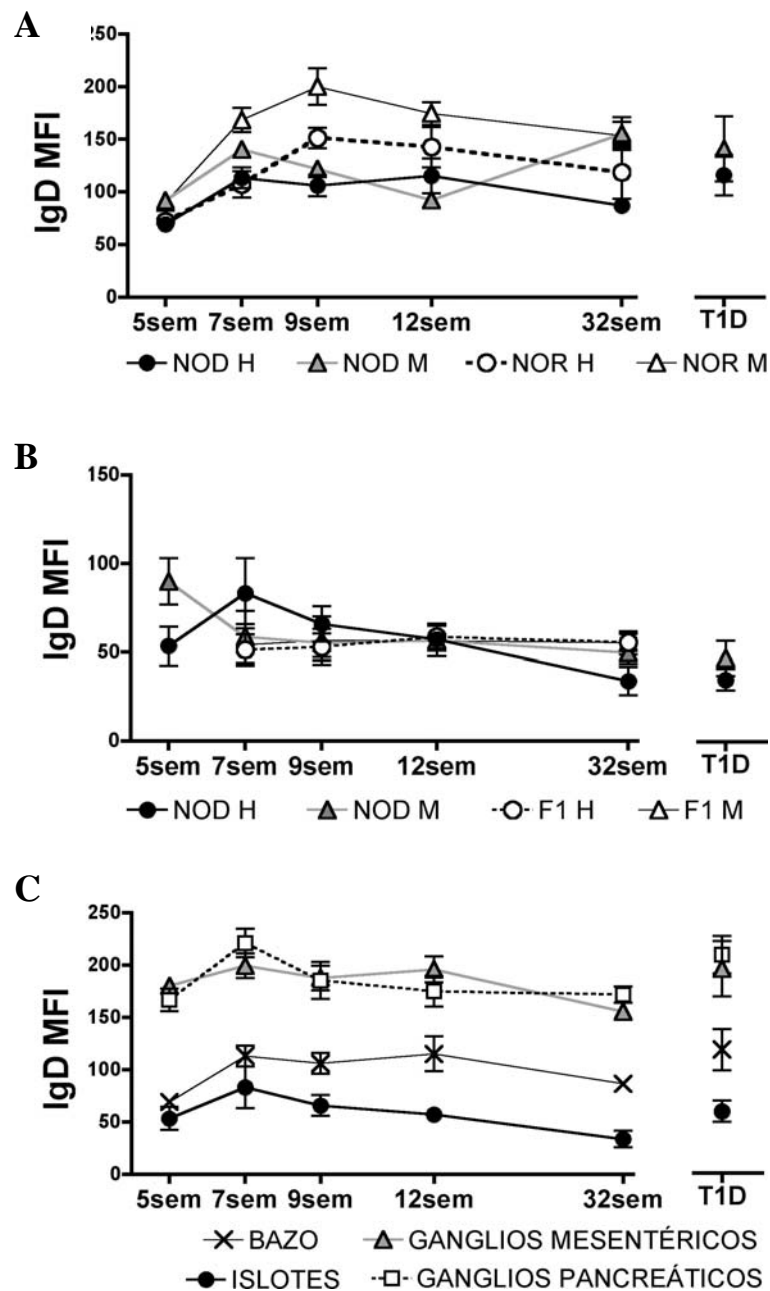


Figura 24. Análisis cuantitativo, mediante citometría de flujo, de la variabilidad en los niveles de expresión de IgD en la superficie de los linfocitos B, en función de la cepa, sexo, edad y órgano estudiado. Se representa la mediana de la intensidad de fluorescencia en la población de linfocitos B. En cada punto se muestra la media y error estándar, representativos de un mínimo de 3 animales. A. Expresión de IgD en los linfocitos B de bazo en machos y hembras de las cepas NOD y NOR. B. Niveles de IgD en los linfocitos B del infiltrado linfocitario de islotes pancreáticos, en machos y hembras NOD y F1(NODxNOR). C. Figura comparativa del nivel de expresión de IgD en linfocitos B en las poblaciones linfocitarias procedentes de bazo, ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios linfáticos pancreáticos e infiltrado pancreático, de hembras NOD. H=hembras, M=machos

## **2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS LINFOCITOS B INFILTRANTES EN ISLOTES**

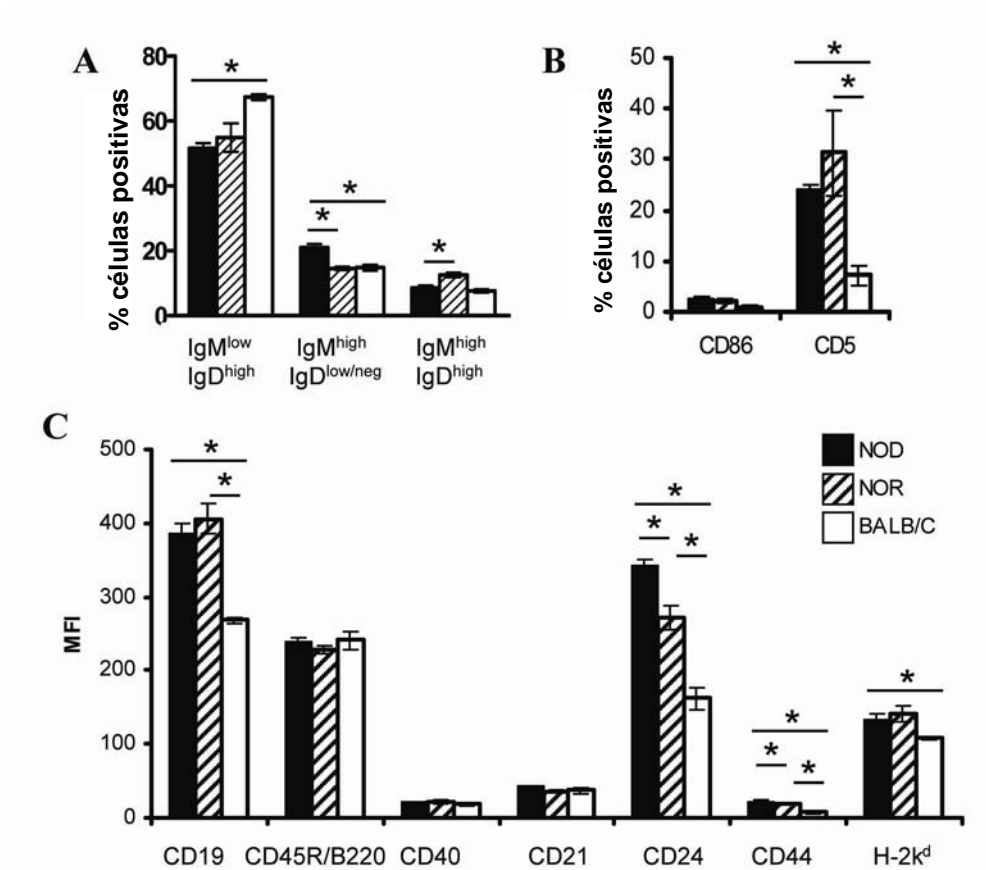
Los resultados obtenidos en el análisis de la evolución de la población de linfocitos B, a lo largo del curso de la diabetes autoinmunitaria, sugieren que los linfocitos B infiltrantes podían tener un papel especialmente importante a las 12 semanas, justo en la etapa pre-diabética, cuando son más abundantes en el infiltrado, tanto en hembras NOD como F1(NODxNOR). Asimismo, la peculiaridad fenotípica que representa la reducida expresión de IgD y del co-receptor CD19, se había visto que era una característica exclusiva de la población de linfocitos B infiltrantes de islote, no compartida por otras poblaciones de linfocitos B, procedentes de bazo o de ganglios linfáticos. Este conjunto de resultados nos llevó a focalizar el estudio sobre hembras de 12 semanas de edad, para realizar una caracterización fenotípica más amplia de los linfocitos B infiltrantes de islote, mediante un estudio comparativo en el que se tomó como referencia la población de linfocitos B esplénicos.

### **2.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS LINFOCITOS B ESPLÉNICOS**

En la bibliografía existen numerosos estudios que han descrito peculiaridades en las poblaciones linfocitarias periféricas de cepas murinas con susceptibilidad a enfermedades autoinmunitarias. Puesto que en nuestro estudio estas poblaciones periféricas iban a ser tomadas como referencia, se realizó una primera caracterización fenotípica de la población de linfocitos B presentes en órganos linfoides secundarios en ratones NOD, en comparación con otras cepas.

Con este objetivo se llevó a cabo el análisis de los niveles de expresión de diversos antígenos de superficie, en linfocitos B esplénicos de ratones NOD (susceptibles a diabetes), NOR (con background genético de predisposición a desórdenes de tipo autoinmunitario, pero resistentes a diabetes) y BALB/c (controles sanos). El estudio se realizó en hembras de 12 semanas de edad, analizándose un mínimo de cinco individuos por grupo. En cada una de las muestras se analizó el porcentaje de positividad y el nivel de expresión de los siguientes antígenos de superficie: el marcador específico de linfocitos B CD45R/B220, las inmunoglobulinas de membrana IgM e IgD, los co-receptores CD19 y CD21, el marcador de madurez CD24, la molécula de MHC de clase I (H-2k<sup>d</sup>), los marcadores de activación CD40 y CD44, las moléculas coestimuladoras CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2), y los marcadores de subpoblación CD11b (Mac1) y CD5. No se llevó a cabo un análisis comparativo de la expresión de moléculas de MHC de clase II, debido a que el haplotipo presente en la cepa BALB/c, es diferente al de los animales NOD y NOR, y por tanto no hubiese podido utilizarse el mismo anticuerpo para el análisis de las diferentes muestras.

Los resultados obtenidos reflejan diferencias significativas, a nivel de linfocitos B esplénicos, especialmente entre las dos cepas con background de autoinmunidad, NOD y NOR, y la cepa control BALB/c (Fig. 25).



**Figura 25.** Caracterización fenotípica de los linfocitos B esplénicos de los ratones NOD, en comparación con las cepas NOR y BALB/c. **A.** Proporción relativa de las subpoblaciones de linfocitos B esplénicos IgM<sup>low</sup>IgD<sup>high</sup> (células B maduras), IgM<sup>high</sup>IgD<sup>low</sup> (células B de la zona marginal y transicionales T1) e IgM<sup>high</sup>IgD<sup>high</sup> (transicionales T2), respectivamente. **B.** Porcentaje de células B positivas para los marcadores de superficie CD86 y CD5, respectivamente. **C.** Nivel de expresión de las moléculas CD19, CD45R/B220, CD40, CD21, CD24, CD44 y MHC de clase I (haplotipo H-2k<sup>d</sup>). MFI= mediana de la intensidad de fluorescencia. Cada dato es el promedio de al menos 5 animales; los asteriscos indican diferencias significativas (p<0,05).

Cabe destacar que se observaron diferencias significativas en cuanto a la proporción relativa de las diferentes subpoblaciones de linfocitos B esplénicos: en la cepa NOD se presenta una mayor proporción de los linfocitos B con fenotipo IgM<sup>high</sup>IgD<sup>low</sup> (característico de células B de la zona marginal y de células B transicionales T1), en detrimento de la proporción de linfocitos B maduros (IgM<sup>low</sup>IgD<sup>high</sup>) (Fig. 25-A). Esta desviación probablemente sea debida al incremento en el número de células B de zona marginal de la cepa NOD, puesto que eran expresan CD21

en superficie. En los animales NOR, también se observa una tendencia a presentar menor proporción de linfocitos B maduros en el bazo. No obstante, en este caso, esta característica se ve compensada por un aumento en el compartimento de células B transicionales T2.

Aunque la expresión de ciertos antígenos de superficie como CD80 (indetectable en todos los casos), CD86, CD45R/B220, CD40 y CD21, no presenta diferencias entre las diferentes cepas estudiadas, las células B procedentes de NOD y NOR presentan mayores niveles de expresión de algunos marcadores de activación como CD24, CD19, CD44, y moléculas del MHC de clase I (Fig. 25-B y C).

Se ha observado también que el porcentaje de células B CD5+ es significativamente mayor en el caso de los animales NOD y NOR que en los controles BALB/c, siendo próximo a un 25-30% en el caso de los primeros, mientras que en las muestras control sólo representa un 7% de la población total de linfocitos B (Fig. 25-B). Se descartó la posibilidad de que esta población corresponda a células del tipo B-1, típicamente localizadas en la cavidad peritoneal, ya que no coexpresan el marcador Mac1, distintivo de este subtipo de linfocitos B. Esta población, con toda probabilidad, corresponde a células B-2, que son inducidas a expresar CD5 tras la interacción con un autoantígeno; la expresión de CD5 en estas células B sería mediadora de señales inhibitoras para las propias células.

Ya que las diferencias fenotípicas son menos acusadas entre las cepas NOD y NOR, éstas no parecen estar necesariamente correlacionadas con el desarrollo de la diabetes tipo 1. Más bien, estos resultados son el reflejo del desarrollo de una respuesta autoinmunitaria activa en estas cepas, como sugiere la hiperexpresión de CD19.

## **2.2. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LOS LINFOCITOS B INFILTRANTES EN ISLOTES**

El objetivo de esta fase del estudio era la caracterización fenotípica de los linfocitos B infiltrantes en islotes en hembras NOD y F1(NODxNOR) de 12 semanas de edad, utilizando una serie de anticuerpos dirigidos contra distintos marcadores de superficie para su cuantificación mediante citometría de flujo. Como ya se habían encontrado evidencias suficientes de que esta población celular presentaba un fenotipo diferente al observado en otros órganos linfoides, aquí también se analizó la población de linfocitos B esplénicos como muestra de referencia.

Para analizar la expresión de antígenos de superficie en las muestras de linfocitos infiltrantes, el páncreas fue perfundido con una solución de enzima colagenasa, tras sacrificar los animales, y digerido durante 20 minutos a 37°C. Tras una disgregación mecánica del tejido digerido, los islotes fueron recogidos manualmente, antes de ser disgregados y analizados

mediante citometría de flujo. De esta manera, sólo los linfocitos procedentes del infiltrado (y no los circulantes por los vasos o localizados en tejido intersticial pancreático) fueron evaluados.

De la misma manera, también se analizó la población de linfocitos B infiltrantes de islotes en hembras de 12 semanas de la cepa F1(NODxNOR). En este modelo, que no suele desarrollar diabetes clínica, el infiltrado es considerado de tipo “benigno”.

En cada una de las muestras se evaluó el nivel de expresión, a nivel de membrana celular, de las inmunoglobulinas de membrana IgM, IgD, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA; los componentes CD19 y CD21 del correceptor; el marcador específico de linfocitos B CD45R/B220; el marcador de madurez y/o activación CD24; las moléculas de MHC de clase I (haplotipo H-2k<sup>d</sup>) y clase II (haplotipo I-Ag<sup>7</sup>); los marcadores de activación CD69, CD40 y CD44; las moléculas coestimuladoras CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2); y los marcadores de subpoblación CD11b (Mac1) y CD5.

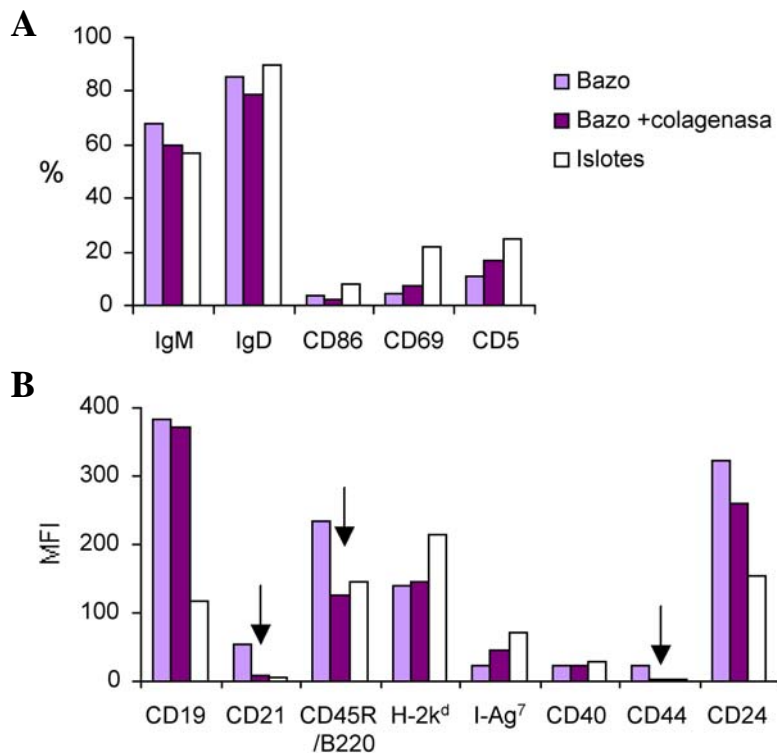
### **2.2.1. Controles de la digestión con colagenasa**

Como se ha comentado anteriormente, la metodología empleada en el aislamiento de islotes pancreáticos, incluía una digestión previa del páncreas con la enzima colagenasa. En este estudio, la preservación de los antígenos de membrana era imprescindible para la correcta interpretación de los resultados, obtenidos mediante citometría de flujo. Puesto que las preparaciones comerciales de colagenasa pueden contener trazas de otras enzimas proteolíticas como tripsina o pepsina, el lote de colagenasa utilizado en este estudio fue previamente testado, sobre muestras de linfocitos esplénicos, para conocer el potencial efecto que la digestión tenía sobre cada uno de los marcadores que se pretendían analizar.

Con esta finalidad, se sobredigerió con colagenasa una alícuota de esplenocitos; para estos controles se siguieron digestiones de 45 minutos, más del doble de lo indicado en la digestión del páncreas (20 minutos). Posteriormente, se realizó la tinción para cada uno de los marcadores estudiados sobre esta muestra sobredigerida, en paralelo con una muestra de esplenocitos sin digerir.

Los resultados obtenidos (Fig. 26) evidenciaron que la digestión con colagenasa afectaba de manera específica a las moléculas CD21, CD44 y CD45R/B220, de tal manera que la expresión de estos antígenos en la población linfocitaria procedente del infiltrado intrainular no podría ser evaluada. Por el contrario, para el resto de marcadores (Ig, CD5, CD69, CD19, MHC clase I y II, CD40 y CD24), el tratamiento de digestión con colagenasa no afectaba a su correcta detección. En el caso de CD80, CD86 y CD11b, cuya expresión era muy escasa en los linfocitos B esplénicos, se realizó el mismo tipo de control de digestión, utilizando líneas celulares con una mayor expresión constitutiva de estas moléculas coestimuladoras; el

resultado obtenido verificó que éstos marcadores tampoco se ven afectados tras la digestión con colagenasa.



**Figura 26.** Controles de digestión de esplenocitos con colagenasa. Comparativa de los resultados obtenidos en esplenocitos sobredigeridos con colagenasa (45 minutos), respecto a muestras de bazo sin digerir, y linfocitos procedentes de infiltrado pancreático (tras 20 minutos de digestión con colagenasa). La gráfica muestra un experimento representativo. **A.** Efecto de la digestión con colagenasa en el porcentaje de células B positivas para los marcadores IgM, IgD, CD68, CD69 y CD5, respectivamente. **B.** Afectación de los niveles de expresión detectados, tras la digestión con colagenasa, de los marcadores CD19, CD21, CD45R/B220, MHC de clase I (haplotipo H-2k<sup>d</sup>) y clase II (haplotipo I-Ag<sup>7</sup>), CD40, CD44 y CD24. Las flechas señalan los marcadores cuya afectación por la digestión con colagenasa anula por completo la fiabilidad de los resultados obtenidos en páncreas.

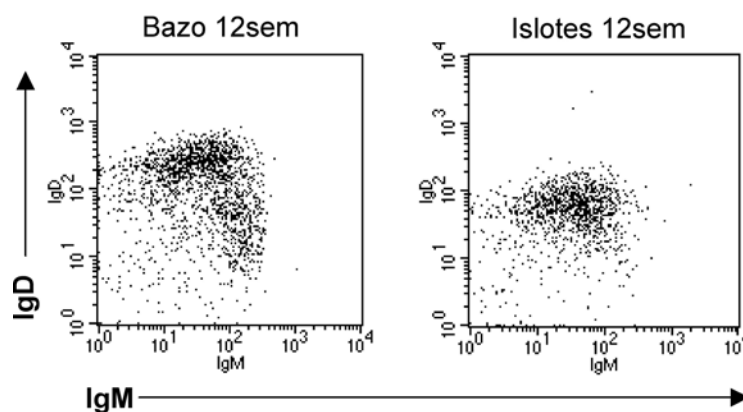
### 2.2.2. Características fenotípicas de los linfocitos B infiltrantes en islotes en el modelo NOD

La caracterización del isotipo de inmunoglobulina expresada en la superficie de los linfocitos B aporta información relativa al origen y estado funcional de los propios linfocitos B. En este estudio se utilizaron anticuerpos para detectar los diferentes isotipos de inmunoglobulina (IgA, IgD, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgM), para determinar su abundancia relativa en cada una de las poblaciones de linfocitos B estudiadas.



En las muestras de infiltrado pancreático, al igual que se había observado en las muestras procedentes de bazo, se presenta una clara predominancia de los isotipos IgD e IgM (Fig. 27); casi un 90% de los linfocitos B expresan IgD e IgM, mientras que sólo un 3% presentan el isotipo IgG1. El resto de isotipos se encuentran muy poco representados (alrededor de un 1%).

En conjunto, el fenotipo mayoritario de linfocitos B infiltrantes corresponde a linfocitos B maduros ( $IgM^{low}IgD^{high}$ ) ya que, de forma similar a lo que ocurre en ganglios linfáticos (datos no mostrados), apenas se detectan linfocitos B en estadios inmaduros o transicionales ( $IgM^{high}$ ). Este hecho, que es común en órganos linfoides secundarios, es sorprendente a nivel del infiltrado pancreático, ya que hace descartar la posibilidad de que esté formado en su mayoría por linfocitos B memoria procedentes de una reacción clásica de centro germinal, ya que en ese caso presentarían cambio de isotipo o al menos ausencia de IgD en superficie. Como ya se ha comentado anteriormente, en los linfocitos B infiltrantes se detecta una disminución, progresiva con la edad, en el nivel de expresión de IgD, aunque continúa siendo claramente positivo, mientras que se presentan pocos cambios en los niveles de IgM.



**Figura 27.** Dot blots representativos de la expresión en membrana de IgD e IgM, en las poblaciones de linfocitos B de bazo e infiltrado pancreático, respectivamente, en hembras NOD de 12 semanas de edad.

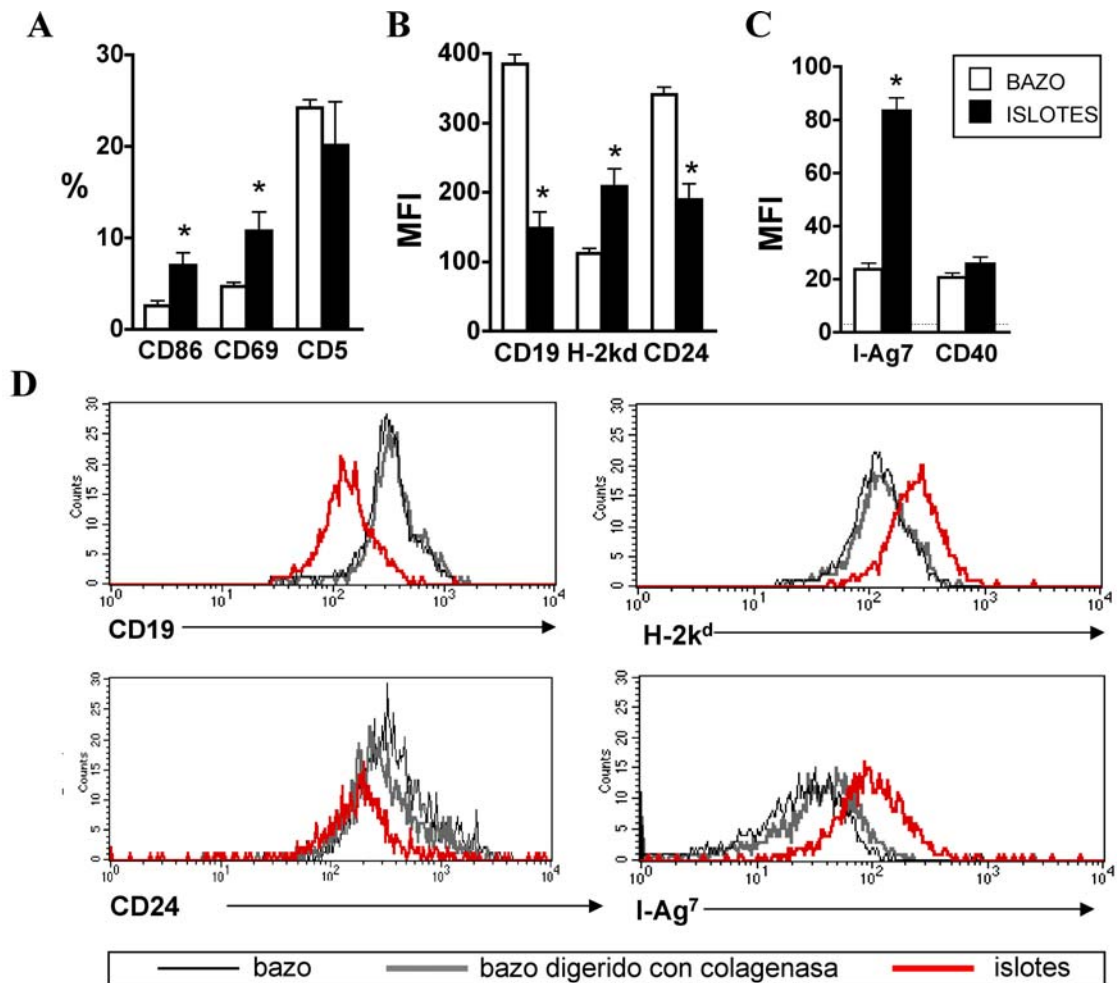
También el porcentaje de linfocitos B  $CD5^+$  (pero  $Mac1^-$ ) en el infiltrado pancreático es similar al observado en el bazo de las hembras NOD (Fig. 28-A). En cambio, se observó un discreto, aunque estadísticamente significativo, aumento en el porcentaje de linfocitos B positivos para el marcador temprano de activación CD69 (11% en linfocitos B infiltrantes *versus* 5% en linfocitos B esplénicos) así como en el porcentaje de células B  $CD86^+$  (7% en la población de linfocitos B infiltrantes *versus* 2,5% en la de bazo), mientras que el nivel de expresión de CD80 en ambas poblaciones siguió siendo indetectable. No obstante, éstas moléculas indicadoras de la activación de los linfocitos B son presentes sólo en una pequeña proporción de la población global de linfocitos B infiltrantes.

En contraposición, y como ya se había observado anteriormente, el nivel de expresión de CD19, componente del complejo correceptor, se encuentra significativamente disminuido en el conjunto global de la población de linfocitos B infiltrantes (Fig. 28-B y D). Aunque ésta característica, por sí misma, no ha sido descrita en la bibliografía con anterioridad, nos sugirió que pudiera ser indicativa de algún tipo de anergia funcional de los linfocitos B infiltrantes. Desgraciadamente, este hecho no podía ser confirmado con datos referentes a la expresión de CD21 en estas células, ya que la detección de este marcador se veía afectada tras la digestión con colagenasa, imposibilitando así su evaluación. En cualquier caso, la reducción en la expresión de CD19 en la superficie de estos linfocitos B, bien podría conllevar un cierto grado de insensibilidad en esta población, ya que CD19 tiene una función clave en la regulación del umbral de activación vía BCR.

De la misma manera, también se observó una menor expresión del antígeno CD24 en la población infiltrante, indicativa de un mayor estado de madurez, o de un menor grado de activación, en esta población.

Curiosamente, y aunque otros marcadores de activación como CD40 no muestran diferencia alguna entre las poblaciones analizadas, las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tanto de clase I (H-2k<sup>d</sup>) como de clase II (I-Ag<sup>7</sup>) se encuentran significativamente hiperexpresadas en la población de linfocitos B que infiltran los islotes pancreáticos (Fig 28-B, C y D). Este hecho no deja de ser paradójico, ya que este aumento en las capacidades de esta población de linfocitos B para presentar antígenos a los correspondientes linfocitos T, en el contexto de moléculas del MHC, no se ve acompañado por un incremento similar, en el conjunto de la población, de moléculas con función coestimuladora (CD80 y CD86).

En conjunto, estos datos indican que, aunque los linfocitos B infiltrantes no parecen provenir de una reacción clásica de centro germinal, posiblemente tampoco son células naive; la hiperexpresión de moléculas presentadoras de antígeno sugiere un encuentro previo con el antígeno, pero en cambio, además de no presentar en su mayoría moléculas de coestimulación, estos linfocitos B parecen estar reprimidos o “silenciados”, ya que sus reducidos niveles de expresión de CD19 dificultarían su activación.



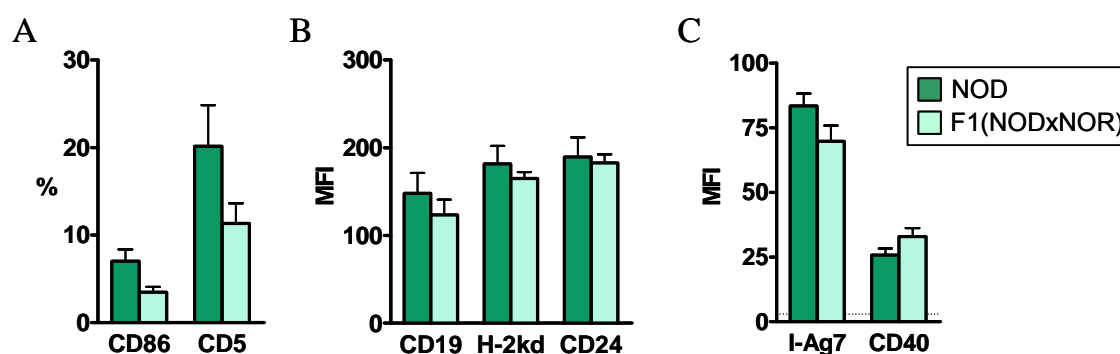
**Figura 28.** Caracterización fenotípica, mediante citometría de flujo, de los linfocitos B infiltrantes de islotes, en hembras NOD de 12 semanas de edad. Comparación con los linfocitos B esplénicos. **A.** Porcentaje de células CD86+, CD69+ y CD5+, respectivamente. **B y C.** Nivel de expresión (representado mediante la mediana de la intensidad de fluorescencia) de los marcadores de superficie CD19, CD24, MHC de clase I (H-2k<sup>d</sup>) y clase II (I-Ag<sup>7</sup>) y CD40, respectivamente. La línea punteada en C representa la intensidad de fluorescencia correspondiente a un control negativo. En todos los diagramas de barras, se representa la media correspondiente a seis individuos, señalando los asteriscos aquellas diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). **D.** Histogramas de experimentos representativos, donde se muestran los niveles de expresión de CD19, H-2k<sup>d</sup>, CD24 y I-Ag<sup>7</sup> en los linfocitos B infiltrantes (línea roja), en comparación con los linfocitos B esplénicos (línea negra), y el correspondiente control de linfocitos B esplénicos sobredigeridos con colagenasa (línea gris).

### 2.2.3. Características fenotípicas de los linfocitos B infiltrantes en animales F1(NODxNOR)

Tras caracterizar la población de linfocitos B que infiltran los islotes pancreáticos en las hembras NOD, el siguiente objetivo fue la caracterización, utilizando la misma metodología, de los linfocitos B infiltrantes en las hembras F1(NODxNOR). En el caso de los animales F1, aunque se desarrolla insulinitis, se considera que se trata de un infiltrado de tipo “benigno”, ya que rara vez acaba desencadenando un efecto destructor de la masa celular beta suficiente como para provocar la diabetes clínica. La finalidad de esta fase del estudio fue caracterizar las posibles diferencias en la población de linfocitos B de este infiltrado “benigno”, en referencia a los linfocitos B que forman parte del infiltrado destructivo de los animales NOD.

La determinación del isotipo de inmunoglobulina presente en la superficie de estos linfocitos B volvió a mostrar una amplia predominancia de IgD e IgM (93%), mientras que el 5% corresponden a IgG1. De nuevo, igual que en el caso de la cepa NOD, los linfocitos B infiltrantes que presentan cambio de isotipo son minoritarios.

Los reducidos niveles de expresión de CD19 y CD24 también son presentes en los linfocitos B infiltrantes en las hembras F1 (Fig. 29). Así mismo, también se puede observar la hiperexpresión de moléculas del MHC de clase I (H-2k<sup>d</sup>) y clase II (I-Ag<sup>7</sup>), en la práctica ausencia de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) en la mayor parte de esta población, a la vez que se detectan pocos cambios en los niveles de marcadores de activación (CD69 y CD40).



**Figura 29.** Análisis de la expresión en superficie de los diferentes marcadores, estudiados mediante citometría de flujo, en linfocitos B infiltrantes de islotes en hembras NOD y F1(NODxNOR) de 12 semanas de edad. **A.** Porcentaje de linfocitos B positivos para los marcadores CD86 y CD5, respectivamente. **B** y **C.** Nivel de expresión, expresado como mediana de la intensidad de fluorescencia de la población CD19+, de CD19, CD24, MHC de clase I (H-2k<sup>d</sup>) y clase II (I-Ag<sup>7</sup>) y CD40, respectivamente. La línea punteada en C representa la intensidad de fluorescencia correspondiente al control negativo. En los gráficos no aparece ningún asterisco porque no se detectaron diferencias significativas entre las dos cepas, según el test U de Mann-Whitney.

En conjunto, el fenotipo que presentan los linfocitos B infiltrantes en el modelo F1(NODxNOR) es equivalente al descrito anteriormente para el modelo NOD, puesto que no se encontraron diferencias, estadísticamente significativas, entre los marcadores estudiados en los linfocitos B infiltrantes de ambos grupos de animales.

### **3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS LINFOCITOS B INFILTRANTES EN ISLOTES**

Hasta este punto del estudio, se habían observado ciertas características fenotípicas, exclusivas de los linfocitos B que forman parte del infiltrado intrainular, tanto en el modelo NOD como en F1(NODxNOR). Éstas sugerían un estado activamente “silenciado” en esta población infiltrante. En este capítulo se aborda el estudio de las características funcionales de esta población celular.

En primer lugar, y puesto que los resultados del análisis fenotípico, en relación a la disminuida presencia en superficie de la componente CD19 del complejo correceptor, podían sugerir, hasta cierto punto, alguna semejanza con un estado de anergia funcional (típicamente caracterizado por una disminución en la expresión del componente CD21), esta posibilidad fue analizada en profundidad mediante la caracterización “in vitro” de la respuesta de esta población de linfocitos B frente a diferentes estímulos activadores.

Por otro lado, para conocer la posible influencia de los linfocitos B infiltrantes sobre la población de linfocitos T, también residente en los islotes, se analizó la producción diferencial de ciertas citoquinas, por parte de los linfocitos B infiltrantes, para discriminar si éstos podían estar influyendo en el desarrollo preferencial de una respuesta tipo Th1/Th2. Así mismo, se llevaron a cabo una serie de ensayos de proliferación “in vitro”, en presencia de diferentes estímulos, donde se evaluó la capacidad de la población de linfocitos B para potenciar/inhibir la activación de los linfocitos T.

#### **3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS B INFILTRANTES A LA ACTIVACIÓN “IN VITRO”**

Los linfocitos B infiltrantes de islotes, tanto en el modelo NOD como en el F1(NODxNOR), se caracterizan por una reducida expresión de CD19, en comparación con los linfocitos B de otras poblaciones periféricas (tanto en bazo como en ganglios linfáticos). En la bibliografía no hay otras referencias que describan esta característica, en alguna condición fisiológica y/o patológica. Partiendo de la premisa que CD19 forma parte del complejo correceptor de los linfocitos B, cuya función es la de modular la activación de la célula B, disminuyendo el umbral de estimulación necesaria para activar la vía de señalización del BCR, una disminución en la presencia de CD19 bien podría dificultar la activación del propio linfocito B. Esto se ha descrito

que funciona así, en el caso de linfocitos B anérgicos, cuando es el el componente CD21 del correceptor el que se ve disminuido. Pero en este caso, no ha sido posible la evaluación de la expresión de CD21 en la población celular de estudio, ya que este antígeno se ve afectado por el protocolo seguido para la obtención de los islotes pancreáticos (digestión enzimática con colagenasa). Por otro lado, tampoco se observa en estos linfocitos B una disminución significativa del nivel de expresión de IgM (aunque sí de IgD), también característica de poblaciones anérgicas. Con estos datos, se consideró necesario evaluar, en mayor profundidad, el posible estado de anergia en los linfocitos B infiltrantes de islotes.

Con este objetivo, se realizaron ensayos de estimulación “in vitro” de linfocitos B. También en esta ocasión, y siguiendo la línea metodológica utilizada en experimentos comentados anteriormente, se analizaron linfocitos B procedentes islotes y bazo de hembras de 12 semanas de edad, es decir en el momento en que la insulinitis llega a su estado más avanzado, justo antes de aparecer los primeros casos de diabetes clínicamente manifiesta.

Se utilizaron diferentes agentes estimuladores: algunos cultivos fueron suplementados con LPS (lipopolisacárido de origen bacteriano), el cual activa de forma policlonal los linfocitos B, mediante la unión a receptores de tipo TLR (*Toll-like receptors*, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos), sin necesidad de la participación de células T; paralelamente otros cultivos fueron estimulados con anti-CD40 + IL-4, de manera que la estimulación de la célula B tiene lugar mediante las mismas vías de señalización que se ven implicadas en las respuestas mediadas por células T. Otros cultivos, utilizados como control negativo, simplemente fueron mantenidos en medio de cultivo completo.

Los cultivos así estimulados, fueron analizados a tiempo 0, así como tras 24 y 48 horas desde la aplicación de los diferentes estímulos. El fenotipo de la población de linfocitos B resultante fue analizado mediante citometría de flujo, midiendo la expresión de los antígenos de superficie CD19, CD40, CD44, CD69, MHC clase I y II, CD80 y CD86.

### **3.1.1. Control con medio de cultivo completo**

En los cultivos control no estimulados, pero también analizados mediante citometría de flujo, se observó que, ya a las 24 horas tras haber puesto las células en cultivo, se pueden detectar cambios fenotípicos significativos, especialmente en los linfocitos B procedentes del infiltrado pancreático (Fig. 30): el nivel de expresión de CD19 aumenta perceptiblemente, situándose a niveles similares a los cultivos procedentes de bazo, a las 48 horas. También se incrementa ligeramente la expresión de moléculas de MHC de clase I (H-2k<sup>d</sup>) y CD86 en los linfocitos B infiltrantes de islotes, aunque no haya ninguna clase de estímulo adicional en el cultivo.

### **3.1.2. Estimulación con LPS**

En primer lugar, se hizo evidente que en todos los casos, ya a las 24 horas de cultivo, se podían distinguir agregados celulares característicos de proliferación, en aquellos pocillos que habían sido estimulados. Este hecho, en el caso de los cultivos procedentes de infiltrado pancreático, hace descartar la posibilidad de que los linfocitos B se encuentren en un estado de anergia, ya que ésta se define clásicamente por la incapacidad de responder frente a estímulos proliferativos.

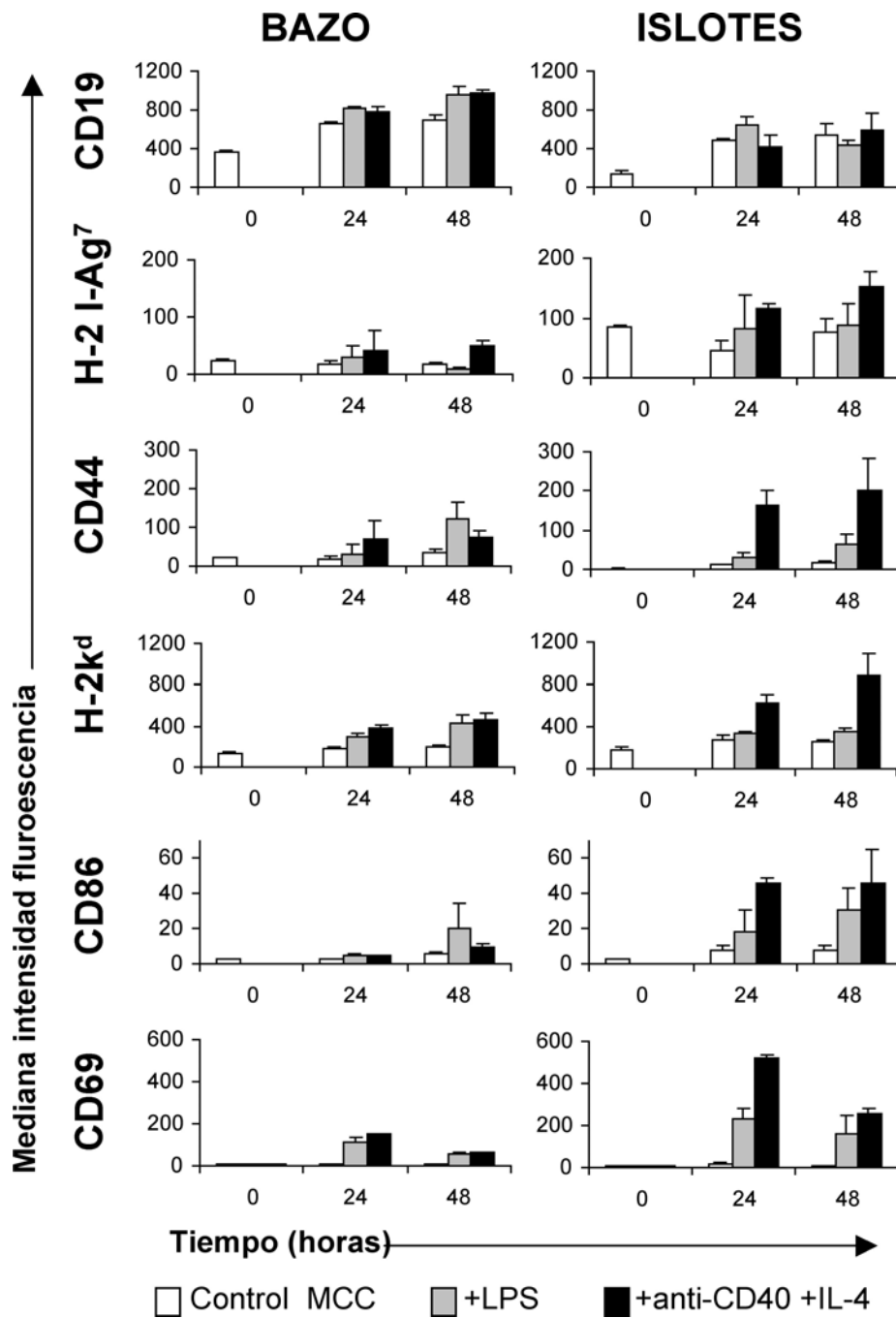
Por otro lado, aunque el LPS es un activador policlonal, cabe destacar la diversidad en la respuesta obtenida, según la población de linfocitos B estudiada: en los linfocitos B esplénicos se observa una mayor potenciación de la expresión del marcador de activación CD44 y de CD19, en cambio, en el caso de los linfocitos B infiltrantes responden con una mayor expresión del marcador de activación temprana CD69 y de moléculas del MHC de clase II (I-Ag7), así como de la molécula coestimuladora CD86.

### **3.1.3. Estimulación con anti-CD40 + IL-4**

La estimulación con anti-CD40 + IL-4, por vía análoga a la mediada por células T, provoca en linfocitos B, tanto procedentes de bazo como de infiltrado pancreático, un aumento en la expresión de CD19 similar al observado en los ensayos de estimulación con LPS. Sin embargo, tras 48 horas de estimulación de las células procedentes de islotes, a diferencia de los cultivos de linfocitos esplénicos, se ha observado en los linfocitos B un incremento muy importante en la expresión de moléculas del MHC, tanto correspondientes a clase I (H-2kd) como a clase II (I-Ag7), así como un gran aumento de la expresión de las moléculas CD44 y CD69, ambas indicadoras del grado de activación linfocitaria.

Cabe destacar también que, prácticamente el 100% de esta población de linfocitos B procedentes de islotes, acaba presentando altos niveles de expresión en superficie de la molécula coestimuladora CD86. Por el contrario, se observan pocos cambios en los patrones de expresión de CD80.

Ensayos posteriores evidenciaron que este cambio fenotípico de los linfocitos B infiltrantes puede ser obtenido, de la misma manera, mediante la estimulación "in vitro" con sólo anti-CD40.



**Figura 30.** Análisis de la respuesta a la activación “in vitro” de las diferentes poblaciones de linfocitos B. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo completo solo, o suplementado con LPS o anti-CD40+IL-4. A tiempo 0, 24 y 48 horas, las células fueron recogidas y analizadas, mediante citometría de flujo, para evaluar la expresión de CD19, CD44, CD69, MHC y moléculas coestimuladoras. Los datos representan los datos obtenidos en la población de linfocitos B (CD19+). Cada experimento se realizó por triplicado, utilizando muestras procedentes de diferentes animales.



Así pues, bajo ciertos estímulos, se hace evidente que la población de linfocitos B infiltrantes no está constituida por linfocitos naive como la mayoría de las presentes en bazo, sino que se trata de células que han podido tener un contacto previo con el antígeno correspondiente, y que pueden llegar a presentar un fenotipo potencialmente activador. Sin embargo, bajo las circunstancias existentes en el infiltrado pancreático, estos linfocitos B infiltrantes parecen estar reprimidos, ya que su simple cultivo en medio de cultivo completo, que facilita su liberación del espacio intransular, revierte rápidamente su fenotipo “silenciado” caracterizado por la baja expresión de CD19.

Aunque se han realizado ensayos de estimulación tanto de muestras procedentes de animales susceptibles a diabetes autoinmunitaria (NOD) como de controles resistentes (F1), los resultados obtenidos son equivalentes en ambas cepas.

### **3.2. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS**

Como se describe en la sección IV/I.1., los linfocitos B se distribuyen de forma dispersa en el infiltrado que invade los islotes pancreáticos, y en íntimo contacto con los linfocitos T. Dada la proximidad física entre estas poblaciones linfocitarias, hipotetizamos que la supuesta producción de citoquinas, por parte de los linfocitos B infiltrantes, podría influir de manera directa sobre la población de linfocitos T adyacente. Partiendo de esta premisa, el objetivo de esta fase del estudio fue el análisis de la producción de diferentes tipos de citoquinas, por parte de la población de linfocitos B infiltrantes en islotes.

El objetivo primordial era la detección y cuantificación de citoquinas en condiciones fisiológicas, es decir, manteniendo el estado funcional de las células tal y como están dentro del microambiente (moléculas de adhesión, ligandos, quimiocinas, citoquinas,...) que existe en interior del infiltrado pancreático. Para ello se siguió un protocolo de detección intracelular de citoquinas mediante citometría de flujo. Esta técnica permite la cuantificación de la cantidad de citoquina producida y del porcentaje de células productoras, monitorizando en todo momento la población de células B (CD19+). Sin embargo, como el nivel de producción de citoquinas suele ser discreto, por el potente efecto que producen aún en bajas concentraciones, es difícil detectarlas en las poblaciones linfocitarias, a no ser que éstas sean activadas de forma exógena. Por esta razón, los islotes pancreáticos, tras ser aislados, fueron estimulados con PMA+Ionomicina durante 5 horas a la vez que se bloqueaban los mecanismos de secreción celulares; el tiempo necesario para que la cantidad de citoquinas acumuladas fuera suficiente para ser detectadas mediante citometría. Este método de estimulación con PMA+Ionomicina está descrito que sólo potencia la activación celular, sin desviar el tipo de respuesta obtenida.

Tras esta estimulación, las células fueron fijadas y permeabilizadas para la detección de citoquinas intracelulares. Se utilizaron anticuerpos contra 3 citoquinas diferentes: IFN $\gamma$ , como

modelo de citoquina de tipo Th1; IL-4, potenciadora de respuestas de tipo Th2; e IL-10, con funciones reguladoras/supresoras de la activación linfocitaria (Th0). Mediante este sistema, se pretendía conocer si los linfocitos B infiltrantes tienen la capacidad de influir "in situ", mediante la secreción de citoquinas, sobre la respuesta de células adyacentes.

Como en los capítulos anteriores, el estudio se realizó utilizando muestras de hembras NOD y F1(NODxNOR) de 12 semanas de edad. Comparando siempre los resultados obtenidos en las células B infiltrantes, con células B procedentes de bazo.

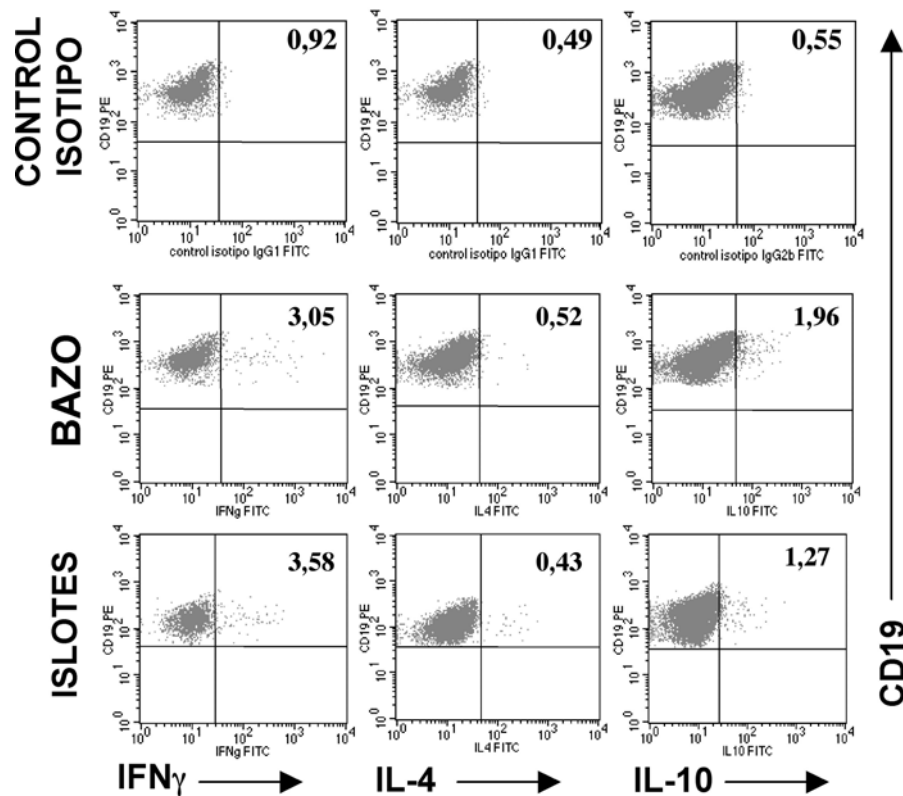
En el análisis de las muestras, mediante citometría de flujo, se detectó que aproximadamente un 3% de los linfocitos B infiltrantes son productores de IFN $\gamma$ , mientras que sólo un 1% corresponde a células productoras de IL-10 (Fig. 31). En cambio, la capacidad de producción de IL-4 es prácticamente indetectable, o al menos no cuantificable con fiabilidad. Aunque estas poblaciones productoras de citoquinas son minoritarias, podrían indicar una potenciación de la respuesta de tipo Th1. Sin embargo, los porcentajes referidos son similares a los obtenidos en poblaciones de linfocitos B procedentes de bazo. De la misma manera, tampoco se aprecian diferencias entre las muestras de la cepa NOD y F1.

En función de los datos obtenidos, en referencia a estas tres citoquinas, los linfocitos B infiltrantes de islotes no presentan un patrón de producción de citoquinas diferente al que puede encontrarse en linfocitos B esplénicos.

### **3.3. EFECTO DE LOS LINFOCITOS B INFILTRANTES SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T**

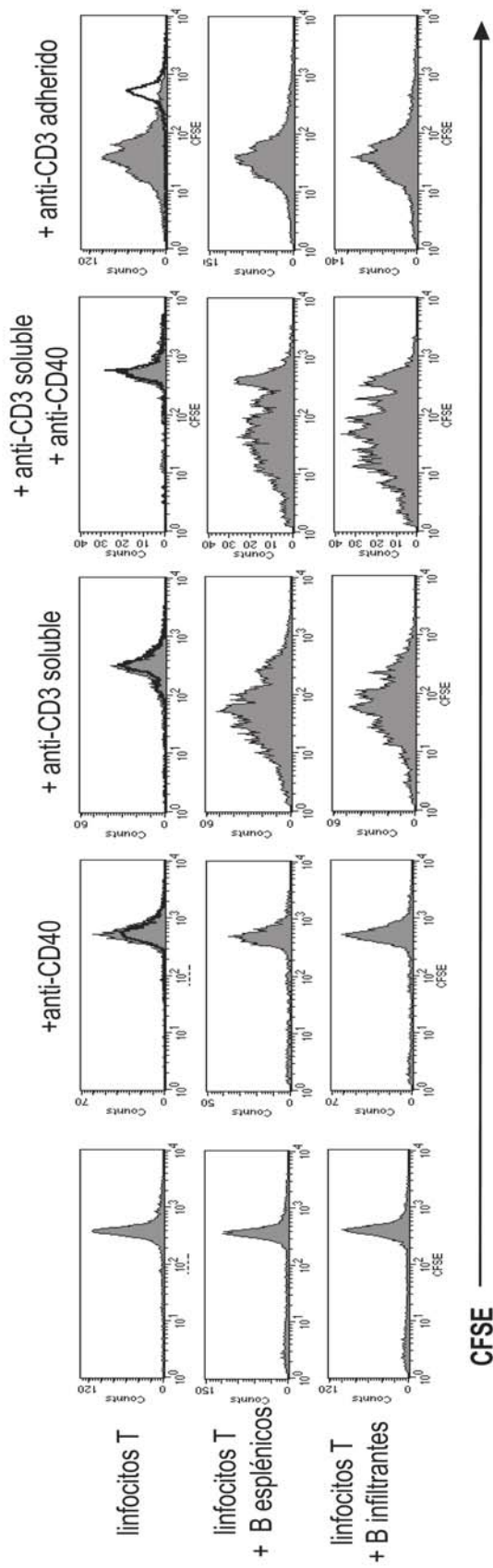
Para caracterizar, en un aspecto diferente, las capacidades funcionales de los linfocitos B infiltrantes de islotes, se evaluó el efecto potencial de estas células, sobre la activación y proliferación de los linfocitos T adyacentes.

Con este objetivo se purificaron mediante sorting las poblaciones de linfocitos B (CD19+) y linfocitos T (CD3+), procedentes de islotes pancreáticos, así como los respectivos controles de bazo, de hembras NOD y F1(NODxNOR) de 12 semanas de edad. La población de linfocitos T fue marcada intracelularmente con CFSE, para poder realizar posteriormente el seguimiento de su proliferación. A continuación, las poblaciones B y T respectivas fueron cocultivadas, con la adición de diferentes agentes estimuladores. Tras tres días de cultivo, la proliferación de las células T fue evaluada, mediante el análisis por citometría de flujo de los niveles de fluorescencia (CFSE) en esta población, ya que en cada división celular el nivel de fluorescencia disminuye a la mitad. También en este caso los resultados fueron comparados con los obtenidos en cultivos paralelos, con células procedentes de bazo.



**Figura 31.** Patrón de expresión de citoquinas en células B (CD19+) esplénicas e infiltrantes en islotes, procedentes de hembras NOD de 12 semanas de edad. La primera fila corresponde a una muestra de linfocitos B esplénicos, incubados con un anticuerpo control del mismo isotipo que los utilizados en el marcaje de las citoquinas (IgG1 para IFN $\gamma$  e IL-4; IgG2b para IL-10). Para cada muestra, a partir del control de isotipo se ajustó el umbral de positividad (<1% de células positivas en el control negativo). Posteriormente se evaluó el porcentaje de células positivas, para cada una de las citoquinas analizadas, tal como se indica en cada uno de los diagramas. Se muestran los resultados de un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

En ningún caso la población de linfocitos B, por sí sola, fue capaz de promover la proliferación policlonal de los linfocitos T, en ausencia de otros estímulos (Fig. 32). Tampoco la adición de anti-CD40 al cultivo (que habíamos visto que potenciaba las capacidades presentadoras y coestimuladoras de los linfocitos B infiltrantes) o extracto de islotes (como fuente potencial antígeno), fueron capaces de conferir a los linfocitos B esta capacidad.



**Figura 32.** Análisis del efecto de las diferentes poblaciones de linfocitos B, sobre la respuesta de los linfocitos T a la estimulación policlonal "in vitro"; análisis de la proliferación mediante el seguimiento del marcaje intracelular con CFSE. Las poblaciones de linfocitos T y B procedentes de bazo e infiltrado pancreático, y purificadas mediante sorting, fueron cocultivadas durante 3 días en medio de cultivo completo solo o suplementado con anti-CD40 para potenciar la coestimulación de los linfocitos B. Alternativamente, el medio de cultivo también fue suplementado con anti-CD3 soluble, para evaluar la capacidad de los linfocitos B para funcionar como células accesorias, o con anti-CD3 adherido a la placa de cultivo para evaluar la posible actividad inhibidora por parte de estas células. Cada columna corresponde a un ensayo independiente, representativo de dos experimentos realizados en las mismas condiciones. En la primera línea de cada una, el histograma representado con una línea negra gruesa representa el nivel de fluorescencia (CFSE) de una población de linfocitos T sin ningún tipo de estímulo, y que por tanto no han tenido proliferación durante el tiempo de cultivo.

Cuando se añadió anti-CD3 soluble al medio, los linfocitos B infiltrantes, igual que los esplénicos, funcionaron como células accesorias, sustentando la interacción de los linfocitos T con el anti-CD3 y promoviendo así su proliferación. Sin embargo, el nivel de proliferación de los linfocitos T fue el mismo, tanto si se utilizaban linfocitos B infiltrantes o de bazo, aunque se suplementase el cultivo con anti-CD40 o con extracto de islotes.

Por otro lado, en cultivos donde la proliferación policlonal de linfocitos T fue activada mediante anti-CD3 unido a placa (sin necesidad de células accesorias), los linfocitos B no fueron capaces, en ningún caso, de inhibir total o parcialmente esta proliferación.

Así pues, los resultados fueron similares tanto si se complementaba el cultivo con linfocitos B infiltrantes o esplénicos. Las respuestas proliferativas obtenidas en cultivos con linfocitos T infiltrantes tampoco se mostraron diferentes de las observadas en los cultivos de linfocitos T esplénicos.

Parece, por tanto, que la población de linfocitos B infiltrantes, tanto de hembras NOD como F1, no presenta ninguna peculiaridad "in vitro" en su influencia sobre la proliferación policlonal de los linfocitos T.





## **IV. RESULTADOS / 2**

**CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA  
DEL PATRÓN DE RECONOCIMIENTO  
NEUROENDOCRINO PREDOMINANTE  
EN LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS B  
INFILTRANTES**





La mayor parte del conocimiento de que se dispone actualmente sobre los autoantígenos reconocidos por los linfocitos B, implicados en la diabetes autoinmunitaria, procede de la caracterización de autoanticuerpos circulantes, presentes en el suero de los pacientes de T1D. Aunque no se conoce con certeza su función y/o efectos, lo cierto es que estos autoanticuerpos son una herramienta fundamental en el diagnóstico diferencial, e incluso en el pronóstico de desarrollo, de la diabetes de tipo 1.

Se ha estudiado también la especificidad antigénica de los linfocitos B autorreactivos, implicados en la diabetes autoinmune, mediante la producción de hibridomas. Sin embargo, hasta la fecha, en todos los casos se habían utilizado linfocitos B procedentes de poblaciones linfocitarias periféricas, es decir, linfocitos circulantes o esplénicos.

Como se ha comentado anteriormente, nuestro grupo tiene un especial interés en la caracterización de la población de linfocitos B que infiltra los islotes pancreáticos en el modelo murino de diabetes NOD. Con el objetivo de conocer su especificidad antigénica, en nuestro laboratorio se generaron hibridomas derivados de linfocitos B infiltrantes. Los hibridomas obtenidos fueron clasificados según el patrón de tinción que presentaban los anticuerpos monoclonales que producían, en estudios de inmunofluorescencia sobre criosecciones de páncreas de ratón. Curiosamente, los resultados obtenidos revelaron que, en contra de la esperada abundancia de anticuerpos monoclonales específicos para antígenos propios de islote pancreático (ICA), se presentaba una clara prevalencia (53%) de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales que reconocían elementos del sistema nervioso; este reconocimiento no era exclusivo de tejido pancreático, ya que también eran positiva, en los estudios de inmunofluorescencia, la inervación de otros órganos exocrinos y endocrinos, así como algunas estructuras del sistema nervioso central [Carrillo et al., 2005].

Dada la relevancia que parecía tener la respuesta contra elementos del sistema nervioso periférico en la T1D, nos propusimos el objetivo de identificar el/los antígeno/s reconocidos por estos anticuerpos monoclonales.

Disponíamos de un total de 21 clones diferentes de hibridomas con patrón neuronal (Tabla 11, apartado III.7.1). En una primera fase, se eligió el hibridoma 228E1 para realizar las primeras determinaciones, al ser uno de los que mostraban mayor intensidad en las tinciones de inmunofluorescencia sobre tejido.

## 1. SELECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES PRODUCTORAS DE ANTÍGENO

Para poder identificar a nivel molecular el antígeno reconocido por un anticuerpo monoclonal, es necesario poder aislar previamente dicho antígeno. En este caso, nos encontrábamos ante un antígeno que se localiza en estructuras del sistema nervioso. Aunque previamente había sido detectado en tejido pancreático, el sistema nervioso periférico que inerva el páncreas representa sólo una pequeña proporción del total del tejido, como puede observarse en la figura 12 (apartado I.3.3.). Por esta razón, el aislamiento del antígeno de interés a partir de tejido pancreático resultaba poco viable, puesto que éste habría quedado demasiado diluido. Por otro lado, como mostraban las tinciones por inmunofluorescencia que se habían realizado con anterioridad, este antígeno en cuestión tampoco parecía ser especialmente abundante en el sistema nervioso central, como se comprobó en las tinciones sobre secciones de cerebro y cerebelo. Bajo estas premisas, se optó por buscar una línea celular, como fuente de antígeno para este estudio.

Con este objetivo, se analizaron líneas celulares de origen neuronal. Se utilizaron técnicas de inmunofluorescencia indirecta sobre células cultivadas sobre portaobjetos, utilizando el sobrenadante de cultivo del hibridoma 228E1, conteniendo el anticuerpo producido por el propio hibridoma, para detectar la presencia del antígeno en la muestra. Además las células fueron fijadas y permeabilizadas para permitir el acceso de los anticuerpos a través de las membranas, y poder acceder así a las estructuras intracelulares.

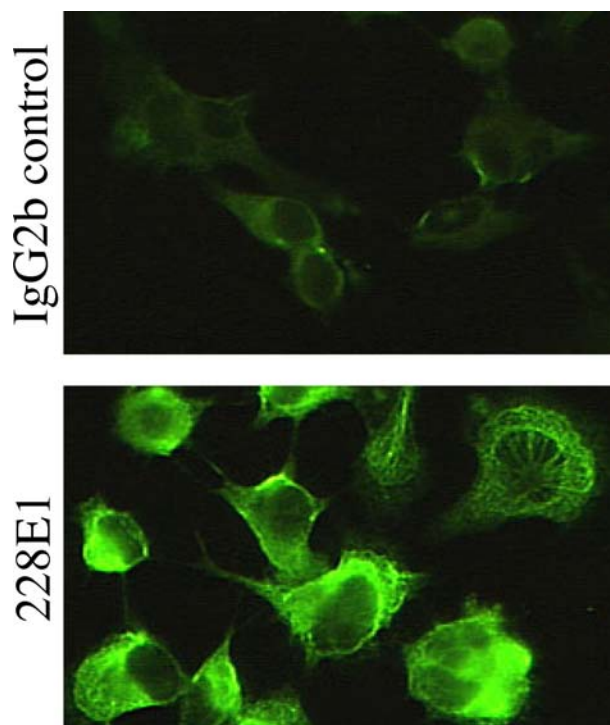
Mediante esta técnica, se pudo detectar la presencia constitutiva del antígeno específico en la línea N1E-115, una línea celular derivada de un neuroblastoma de origen murino, así como en la línea SK-N-SH derivada de un neuroblastoma humano. Sobre las células en cultivo, la detección del antígeno, como se observa en la figura 33, muestra claramente un patrón reticulado en el citoplasma. Esta distribución indica que el antígeno es, con toda probabilidad, un elemento constitutivo del citoesqueleto celular, o asociado a éste.

Las tinciones control, en las que se usó un anticuerpo primario no relevante pero con el mismo isotipo que el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 228E1 (IgG2b), dieron resultado negativo, lo que corroboró que el patrón reticular anteriormente descrito es consecuencia de una interacción específica antígeno-anticuerpo.

Por el contrario, mediante estas técnicas de inmunofluorescencia, no se detectó la presencia del antígeno específico para el hibridoma 228E1 en la línea de insulinoma NIT-1, ni en la línea de fibroblasto SV-T2 (control negativo).

Con estas observaciones se pudo concluir que el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 228E1 es un elemento del citoesqueleto celular expresado, de forma específica,

por líneas celulares de origen neuronal. Este antígeno también se encuentra, y con suficiente homología molecular, en otras especies, como demuestra la reactividad cruzada del anticuerpo con líneas de neuroblastoma humano.



**Figura 33.** Inmunofluorescencia sobre un cultivo de neuroblastoma murino N1E-115. Las células fueron cultivadas sobre portaobjetos; tras los procesos de fijación y permeabilización, las muestras fueron incubadas con el sobrenadante del hibridoma 228E1, o con su correspondiente control de isotipo IgG2b. Se utilizó un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón, marcado con Alexa480, para su visualización. En la tinción con 228E1 se puede observar un marcaje con patrón reticular citoplasmático.

## 2. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO

Una vez seleccionada la línea de neuroblastoma murino N1E-115 como fuente de antígeno, el siguiente objetivo fue la caracterización y aislamiento del mismo.

Inicialmente, se había previsto purificar el antígeno mediante inmunoprecipitación. Esta técnica consiste en la purificación del antígeno, a partir de un extracto de proteínas del cultivo celular, mediante un primer paso de unión al anticuerpo a estudiar, seguido de una incubación con bolas de sefarosa recubiertas de Proteína G o Proteína A. De esta manera, los inmunocomplejos formados por la unión antígeno-anticuerpo son adheridos a la superficie de las bolas debido a la afinidad de la Proteína G/A por la región constante de los anticuerpos,

facilitando así su posterior aislamiento mediante precipitación. Esta técnica además, es compatible con la conservación de los posibles epítomos conformacionales de los antígenos, ya que se puede realizar en condiciones no desnaturizantes. Sin embargo, en nuestro caso, al encontrarnos ante un antígeno asociado a citoesqueleto, el uso de esta técnica experimental tuvo que ser descartado; el citoesqueleto es una estructura proteica altamente insoluble, que sólo puede ser solubilizada mediante la utilización de detergentes desnaturizantes (SDS). En esta situación, se dificulta el mantenimiento de unas condiciones experimentales que favorezcan la solubilidad de estas proteínas, a la vez que permitan la eficiencia de la interacción antígeno-anticuerpo, necesaria para la correcta inmunoprecipitación. Por esta razón se optó por recurrir a técnicas de inmunoblot para caracterizar el antígeno reconocido por los anticuerpos monoclonales.

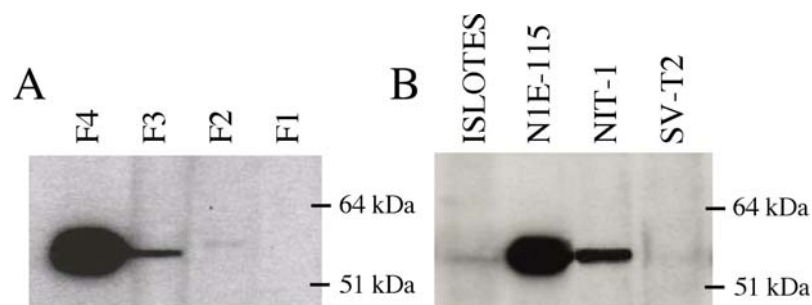
Para caracterizar la localización subcelular del antígeno estudiado se siguió un protocolo de extracción fraccionada de proteínas, a partir de los cultivos de líneas celulares, que permitió la obtención secuencial de diferentes fracciones proteicas, en función de su solubilidad; de esta manera se obtuvo una fracción rica en proteínas solubles en el citosol (F1), una fracción conteniendo aquellas proteínas asociadas a membrana (F2), una fracción enriquecida en proteínas asociadas a cromatina (F3), y una fracción de proteínas altamente insolubles (F4) básicamente compuesta por elementos procedentes del citoesqueleto. De esta manera, se consiguió recuperar las proteínas de todos los compartimentos celulares por separado, a la vez que se enriqueció la representación de proteínas dentro de cada fracción, al disminuir la diversidad. Así se facilita la detección de proteínas poco abundantes.

## **2.1. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO MONOCLONAL PRODUCIDO POR EL HIBRIDOMA 228E1**

Para detectar la presencia del antígeno en las diferentes fracciones celulares derivadas del cultivo de neuroblastoma N1E-115, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE y posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa. Sobre las membranas se realizó la inmunodetección utilizando, una vez más, el sobrenadante de cultivo del hibridoma 228E1.

El resultado de los Western blots indicó claramente que el antígeno en cuestión se encontraba mayormente representado en la Fracción 4 del extracto proteico de la línea N1E-115 (Fig. 34-A), confirmando así los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia, que ya sugerían que el antígeno era un componente del citoesqueleto celular. Concretamente, se trata de una proteína de unos 56 kDa que, a juzgar por la positividad del marcaje tras la desnaturización de la muestra (en la propia extracción de proteínas y en la electroforesis), está siendo reconocida por el anticuerpo monoclonal 228E1 mediante de un epítomo lineal (no conformacional).

De nuevo, y ya utilizando únicamente la fracción de proteínas de citoesqueleto (F4), se volvió a analizar la presencia del antígeno en otras líneas celulares mediante Western blot. Como se puede observar en la figura 34-B, la línea celular control, correspondiente al fibroblasto SV-T2, sigue mostrando negatividad con esta técnica. Por el contrario, se detectó la presencia del antígeno de 56kDa en la F4 correspondiente a la línea de insulinoma NIT-1, aunque resulta evidente que la abundancia relativa es significativamente menor que en el extracto de neuroblastoma. En el extracto de islotes la detección del antígeno, aunque positiva, fue muy débil; en este caso cabe tener en cuenta que el extracto proteico obtenido de islotes recogidos manualmente corresponde a una mezcla de tipos celulares endocrinos, contribuyendo así a la dilución de la proteína de interés en la muestra final.



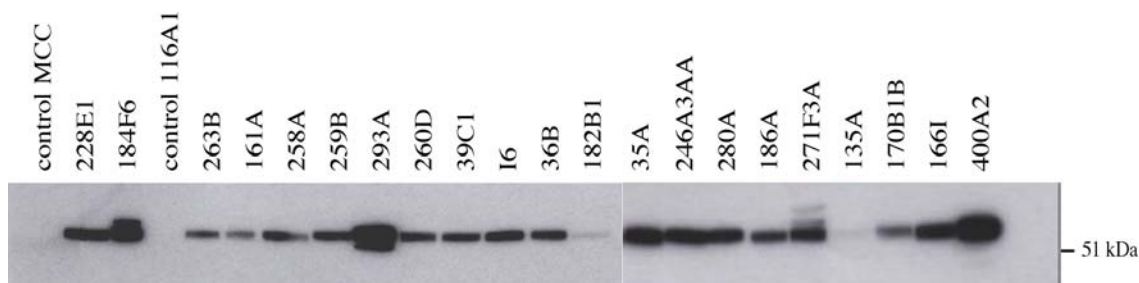
**Figura 34.** Western blots revelados con el sobrenadante del hibridoma 228E1. **A.** Detección del antígeno sobre las diferentes fracciones subcelulares obtenidas de neuroblastoma N1E-115: F4 = citoesqueleto, F3 = proteínas nucleares, F2 = proteínas de membrana y F1 = fracción citosólica. **B.** Detección del antígeno en extractos correspondientes a 10  $\mu$ g de proteína de la fracción de citoesqueleto (F4) de la línea celular de insulinoma (NIT-1), de la línea de fibroblasto (SV-T2) y de neuroblastoma (N1E-115), así como de islote pancreáticos aislados de ratones NOD (3  $\mu$ g).

Estos datos aportan una nueva orientación a la concepción que teníamos, previamente, sobre este hibridoma. Mediante las técnicas de tinción indirecta e inmunofluorescencia, que habíamos utilizado anteriormente, sobre secciones histológicas y cultivos celulares, habíamos caracterizado este hibridoma con un patrón restringido para elementos del sistema nervioso. No obstante, a la luz de estos nuevos resultados obtenidos mediante técnicas de inmunoblot, cuya sensibilidad es mayor que las técnicas de inmunofluorescencia, podemos confirmar la presencia del antígeno, aunque en menor cantidad, también en células de origen endocrino derivadas de insulinoma. De esta manera, este hibridoma que había sido clasificado dentro del patrón neuronal, podría ser reclasificado ahora con patrón neuroendocrino.

## 2.2. CARACTERIZACIÓN DEL CONJUNTO DE HIBRIDOMAS CON PATRÓN NEURONAL

Una vez caracterizado, a grandes rasgos, el antígeno reconocido por el anticuerpo producido por el hibridoma 228E1, se planteó la disyuntiva de si este hibridoma sería realmente, o no, un buen representante del conjunto de hibridomas que se habían clasificado dentro del patrón neuronal. Para resolver esta duda, se realizaron Western blots, utilizando como muestra común el extracto proteico de la fracción de citoesqueleto (F4) de cultivo de neuroblastoma N1E-115, y llevando a cabo la inmunodetección con los sobrenadantes de cultivo de cada uno de los hibridomas clasificados con patrón neuronal.

Mediante este análisis comparativo por Western blot se observó que toda la batería de sobrenadantes correspondientes a hibridomas con patrón neuronal (21 en total) parecían estar reconociendo el mismo antígeno de 56kDa en el extracto de proteínas de citoesqueleto de la línea celular de neuroblastoma (Fig. 35). Aunque en algún caso, en 3 de los sobrenadantes estudiados, se detectaba más de una banda en el Western blot, éstas correspondían a proteínas de diferente tamaño en cada uno de los casos y siempre estaban acompañadas de la banda correspondiente al antígeno de 56kDa; de todas formas éstos casos, en los que es posible que se estén dando efectos de reactividad cruzada con otras proteínas u otras isoformas del mismo antígeno, fueron casos aislados y por tanto poco representativos del conjunto de hibridomas estudiados.



**Figura 35.** Western blot sobre extracto de proteínas de citoesqueleto (F4) de neuroblastoma N1E-115. Se analizaron todos los sobrenadantes correspondientes a hibridomas que habían sido clasificados con patrón neuronal. En todos aparece, como mínimo, una banda correspondiente a unos 56kDa, excepto en los controles negativos: medio de cultivo completo (MCC) y anticuerpo monoclonal del hibridoma 116A1, que no reconoce estructuras nerviosas.

Estos resultados indicaban que todos los hibridomas que habían sido clasificados dentro del patrón neuronal, en función del marcaje inmunohistológico de los anticuerpos monoclonales que producen, estaban reconociendo el mismo antígeno, el cual presentaba una distribución neuroendocrina, aunque más abundante en elementos del sistema nervioso.

### 3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ANTÍGENO

Para poder identificar el antígeno reconocido por todos los anticuerpos monoclonales estudiados, es necesario aislarlo primero, para posteriormente poder analizarlo mediante técnicas de espectrometría de masas. Aunque la electroforesis unidimensional en los geles de poliacrilamida nos había sido muy útil en la caracterización inicial del antígeno, no era viable aislar la proteína a partir de estos geles, ya que en la misma zona donde se encuentra nuestra proteína de interés (54-60 kDa) se distribuyen también numerosas proteínas con similar peso molecular.

Como se ha comentado anteriormente, el hecho de que el antígeno fuera una proteína que forma parte del citoesqueleto celular, altamente insoluble, dificultaba en gran medida poderlo purificar mediante técnicas de inmunoprecipitación. Por esta razón se realizó la separación de las proteínas de los extractos F4 del cultivo de neuroblastoma N1E-115 mediante electroforesis bidimensional. Con esta técnica las proteínas fueron separadas espacialmente, en función de su punto isoeléctrico y su peso molecular, dificultando así la posibilidad de que varias proteínas quedasen solapadas en la misma zona del gel. Realizando posteriormente una inmunodetección, sobre las proteínas transferidas a una membrana, se detectó la posición relativa del antígeno y fue aislado para su posterior análisis.

En una primera aproximación, se realizó la separación del extracto proteico mediante isoelectroenfoque en tiras IPG con un rango amplio de pH (4-10), seguido de la separación en geles de poliacrilamida, en función del peso molecular. Tras transferir las proteínas a una membrana y llevar a cabo la inmunodetección con el sobrenadante del hibridoma 228E1, se observó que el antígeno reconocido por este anticuerpo monoclonal era la proteína más abundante en el extracto (la única mancha claramente visible al teñir la membrana con Ponceau S), con un punto isoeléctrico aproximado de 5.5. Con estos datos, y a partir de un gel bidimensional teñido con plata, se recortó la mancha correspondiente al antígeno y se digirió con tripsina, para el posterior análisis del espectro proteolítico mediante espectrometría de masas.

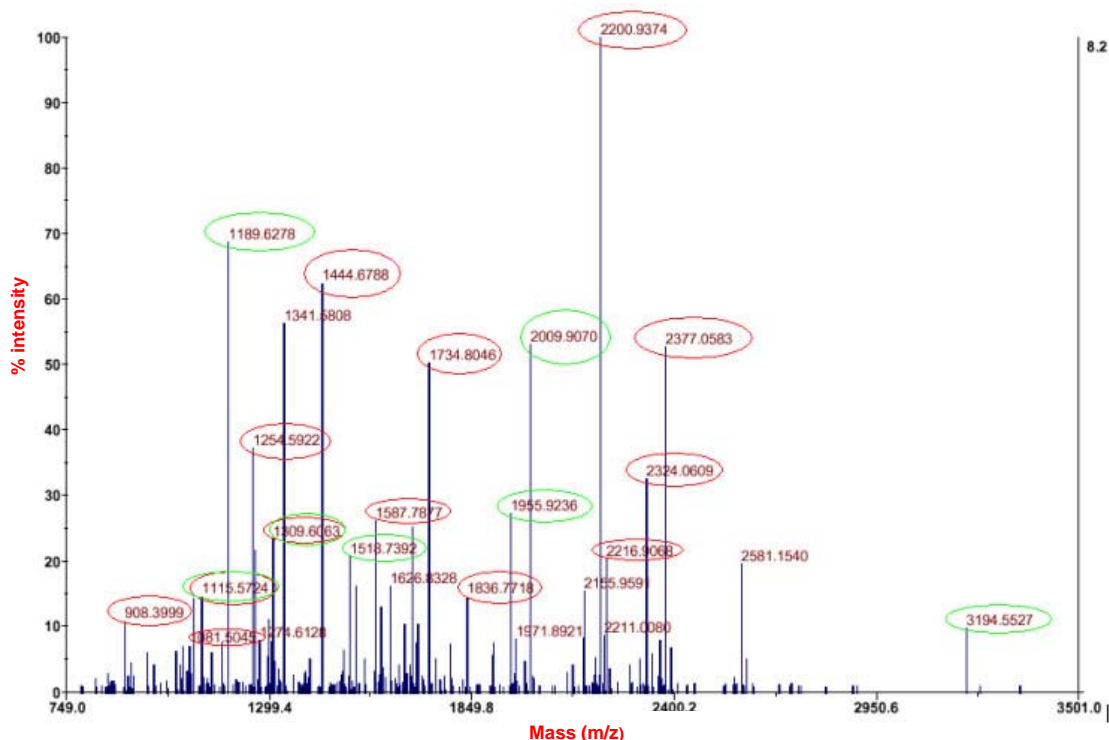
Al analizar los fragmentos peptídicos obtenidos al digerir la muestra con tripsina, se identificó la vimentina como la proteína más abundante en la muestra, al concordar 23 péptidos de los 41 analizados (Tabla 13).

Según estos resultados, cabía proponer a la vimentina como el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 228E1 y, probablemente, el resto de anticuerpos con patrón neuroendocrino. No obstante, este hecho era poco probable, ya que la vimentina es un filamento intermedio expresado mayoritariamente en fibroblastos ("in vivo"), lo cual no concordaba en absoluto con el patrón neuronal obtenido previamente en las tinciones

inmunohistoquímicas. Por otro lado, es necesario tener en cuenta que la mayoría de las líneas celulares establecidas expresan vimentina de forma constitutiva (“in vitro”), independientemente de su origen tisular. Los resultados descritos en el apartado IV/II.2.1. demostraban claramente que el antígeno era producido por líneas de origen neuronal y endocrino, pero no por líneas de fibroblasto, lo cual hacía aún más improbable que fuera la vimentina el antígeno reconocido por este anticuerpo monoclonal.

**Tabla 13.** Proteínas murinas identificadas mediante espectrometría de masas al analizar el spot mayoritario en geles bidimensionales (pH 4-9). En la tabla se indica la probabilidad asociada (score) correspondiente a cada proteína, el número de péptidos identificados, así como el peso y punto isoeléctrico (pI) de dichas proteínas.

Rank	MOWSE Score	Masses Matched	Protein MW (kDa)/pI	Protein Name
1	1.88e+011	23/41 (56%)	53.69 / 5.06	Vimentin
2	1.6e+006	10/41 (24%)	54.27 / 5.40	Peripherin
3	862	4/41 (9%)	51.53 / 4.90	Beclin 1



**Figura 36.** Espectro proteolítico obtenido en la digestión con tripsina del spot mayoritario del gel bidimensional (pH 4-10). En rojo están señalados los péptidos asignados a vimentina, y en verde los asignados a periferina.

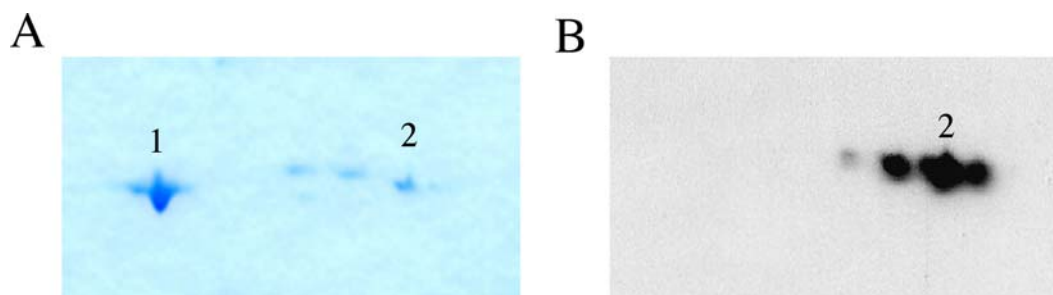


Volviendo al resultado obtenido en el análisis mediante espectrometría de masas, se identificó también la presencia de la proteína periferina en la muestra, aunque con una probabilidad asociada (score) mucho menor que la vimentina, ya que sólo le fueron asignados 10 de los 41 péptidos analizados (Tabla 13). Cabe resaltar que los fragmentos peptídicos asignados a periferina no eran los mismos que ya habían sido asignados a vimentina, y de hecho eran también significativamente abundantes en la muestra analizada, como se puede observar en la figura 36. Estos datos sugieren que ambas proteínas, vimentina y periferina, estaban representadas en la muestra analizada, siendo la primera más abundante. De hecho, el peso molecular y el punto isoeléctrico de ambas proteínas (Tabla 13) es suficientemente similar como para que se encontraran prácticamente solapadas en el gel bidimensional.

Periferina es una proteína con un alto grado de homología estructural con la vimentina, y que al igual que ésta también forma filamentos intermedios. Por esta razón no es extraño que ambas proteínas, en el extracto de citoesqueleto, se distribuyan de forma muy similar en el gel bidimensional. Sin embargo su distribución tisular es muy diferente; a diferencia de lo descrito anteriormente en el caso de la vimentina, periferina se expresa típicamente en neuronas del sistema nervioso periférico (de ahí su nombre), aunque también se ha descrito su expresión a nivel endocrino, en células beta pancreáticas productoras de insulina. Éstas características la perfilan como candidata para ser el antígeno reconocido por los hibridomas con patrón neuroendocrino.

Para evitar que, de nuevo, varias proteínas quedasen solapadas en la zona de interés del gel bidimensional, se diseñó una segunda estrategia, utilizando tiras de IPG con un rango de pH más restringido que las anteriores; como el punto isoeléctrico de la vimentina es 5.06 y el de la periferina es 5.40, se utilizaron tiras con un gradiente de pH entre 4.7 y 5.9, de manera ambas proteínas quedaban suficientemente separadas en el gel bidimensional.

Cuando se realizó la inmunodetección sobre el extracto de proteínas de citoesqueleto, separadas de esta manera, se observó que el antígeno reconocido por el sobrenadante del hibridoma 228E1 ya no coincidía con la proteína más abundante en el gel (Fig. 37), sino que correspondía a una proteína menos abundante, con un punto isoeléctrico mayor. Los dos spots, tanto el correspondiente al antígeno detectado (spot 2), como el más abundante en el gel (spot 1), fueron recortados en un gel teñido con plata, y procesados para su posterior análisis mediante espectrometría de masas.



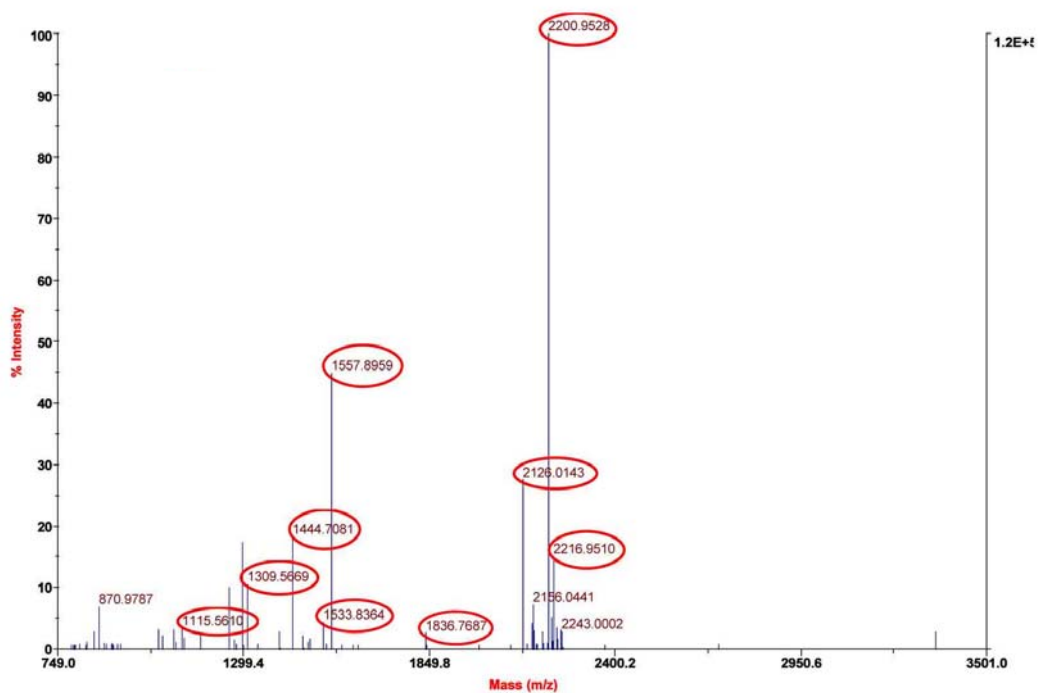
**Figura 37.** Inmunodetección del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal reconocido por el hibridoma 228E1, sobre un extracto proteico (F4) de neuroblastoma N1E-115, separado en gel bidimensional (pH 4,7-5,9). **A.** Tinción del gel con Azul de Coomassie. Se señalan dos spots, el más abundante en el extracto (1) y el detectado en el inmunoblot (2). **B.** Inmunoblot, revelado con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 228E1, sobre la misma porción de gel bidimensional.

Como se describe en los análisis obtenidos mediante espectrometría de masas, el spot 1, correspondiente a la proteína más abundante en el extracto de proteínas de citoesqueleto (Fig. 37) fue claramente identificada como vimentina (Tabla 14 y Fig. 38), siéndole asignados el 50% de los péptidos analizados. De esta manera, quedó descartada la posibilidad de que vimentina fuera el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 228E1, ya que este spot no era detectado en el inmunoblot.

En cambio, el spot 2, siendo relativamente menos abundante, es el que realmente corresponde con el antígeno de interés (Fig. 37). Los datos obtenidos en el análisis de los fragmentos peptídicos obtenidos al procesar esta muestra (Tabla 15 y Fig. 39) demuestran claramente que se trata de la proteína periferina. Ésta fue inequívocamente identificada al haberle sido asignados 24 de los 36 péptidos analizados. Estos 24 péptidos asignados (Tabla 16), en conjunto, suman 220 aminoácidos; teniendo en cuenta que la secuencia total de la periferina está compuesta de 475 aminoácidos, los péptidos asignados cubren un 46,3% del total de la secuencia aminoacídica de la proteína (Fig. 40).

**Tabla 14.** Proteínas murinas identificadas mediante espectrometría de masas al analizar el spot 1 (Fig. 37) . En la tabla se indica la probabilidad asociada (*score*) correspondiente a cada proteína, el número de péptidos identificados, así como el peso y punto isoeléctrico (pI) de dichas proteínas.

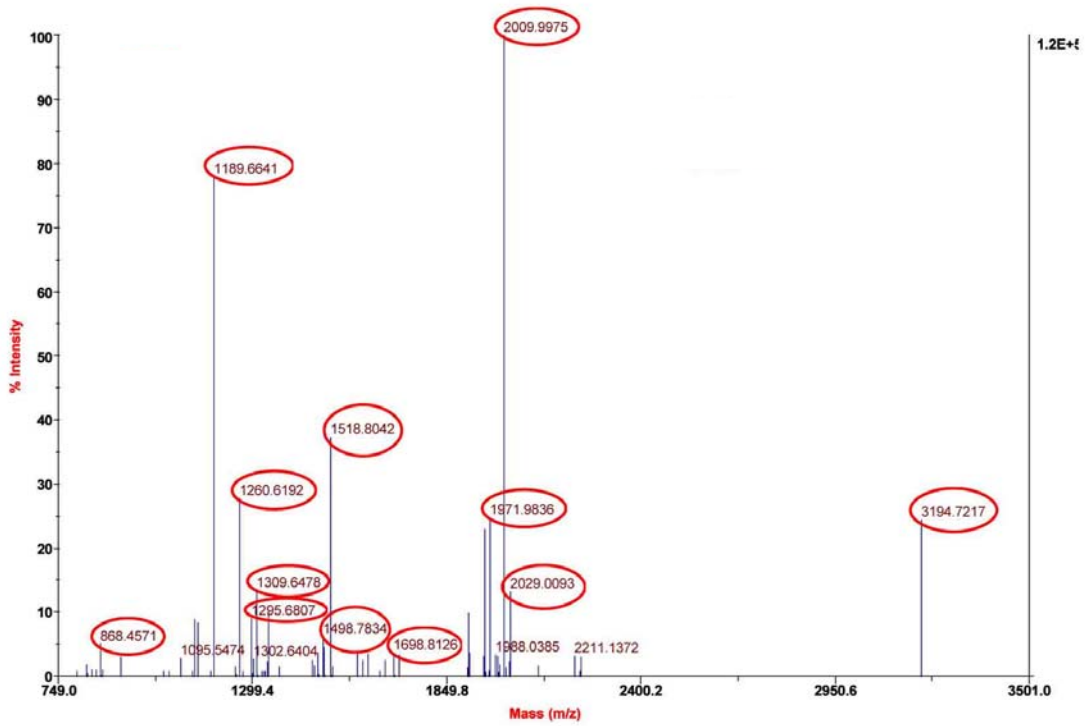
Rank	MOWSE Score	Masses Matched	Protein MW (kDa)/pI	Protein Name
1	9.2e+007	15/30 (50%)	53.69 / 5.06	Vimentin
2	48	4/30 (13%)	57.56 / 5.1	OG2 homebox
3	33.33	4/30 (13%)	53.50 / 5.21	Desmin



**Figura 38.** Perfil proteolítico obtenido al digerir la muestra del spot 1 con tripsina. En rojo están señalados los péptidos asignados a vimentina.

**Tabla 15.** Proteínas murinas identificadas mediante espectrometría de masas al analizar el spot 2 (fig. 5) . En la tabla se indica la probabilidad asociada (*score*) correspondiente a cada proteína, el número de péptidos identificados, así como el peso y punto isoeléctrico (pI) de dichas proteínas.

Rank	MOWSE Score	Masses Matched	Protein MW (kDa)/pI	Protein Name
1	1.2e+011	24/37 (64%)	54.27 / 5.40	Peripherin
2	440	5/37 (13%)	55.59 / 5.62	Cajalin 2
3	85.1	5/37 (13%)	57.45 / 5.97	Chaperonin subunit 2



**Figura 39.** Perfil proteolítico obtenido al digerir la muestra del spot 2 con tripsina. En rojo están señalados los péptidos asignados a periferina.

**Tabla 16.** Péptidos asignados a periferina en el análisis mediante espectrometría de masas del spot 2. De los 36 péptidos resultantes, 24 fueron asignados a periferina. La tabla incluye la secuencia peptídica, la posición dentro de la secuencia de la proteína y las correspondientes modificaciones post-traduccionales. Aunque en la lista aparecen 26 péptidos, dos parejas corresponden a posibilidades alternativas que corresponden a la misma relación masa/carga.

Peptide sequence	start	end	modifications
TFGPPPSLSPGAFSYSSSSR	27	46	
LDFSMAEALNQEFLATR	82	98	
LDFSMAEALNQEFLATR	82	98	1Met-ox
QELQELNDR	103	111	
FANFIEK	112	118	
FLEQQNAALR	121	130	
ADQLCQQELR	144	153	
REDAEHNVLVFR	194	205	
EDAEHNVLVFR	195	205	
KIESLMDEIEFLK	221	233	
KIESLMDEIEFLK	221	234	1Met-ox
IESLMDEIEFLK	222	233	
IESLMDEIEFLK	222	233	1Met-ox
IESLMDEIEFLKK	222	234	
IESLMDEIEFLKK	222	234	1Met-ox
DLQSVESQVQVQVEEATVKPELTAALR	242	270	
NLQEAEEWYK	283	292	
RQIQLTCEVDGLR	321	334	
QIQLTCEVDGLR	322	334	pyroGlu
QIQLTCEVDGLR	322	334	
ELEEQFALEAGGYQAGAAR	346	364	
EYQELLNK	382	390	
MALDIEIATYR	391	401	
ISVPVHSFASLSLK	411	424	
TTVPEMEPLQDSSK	425	439	
TTVPEMEPLQDSSK	425	439	1Met-ox

MPSSASMSHH HSSGLRSSIS STSYRR**TFGP PPSLSPGAFS YSSSSRFSS**  
 RLLGSGSPSS SARLGSFRAP RAGALRLPSE **RLDFSMAEAL NQEFLATRSN**  
**EKQELQELND RFANFIEKVR FLEQQNAALR** GELSQARGQE **PARADQLCQQ**  
**ELRELRRLELE LLGRERDRVQ VERDGLAEDL AALKQRLEEE TRKREDAEHN**  
**LVLFKRDVDD ATLSRLELER KIESLMDEIE FLKKLHEEEL RDLQSVESQ**  
**QVQVQVEEAT VKPELTAALR** DIRAQYENIA **AKNLQEAEEW YKSKYADLSD**  
**AANRNHEALR QAKQEMNESR RQIQLTCEV DGLRGTNEAL LRQLRELEEQ**  
**FALEAGGYQA GAARLEEELR QLKEEMARHL REYQELLNK MALDIEIATY**  
**RKLLEGEESR ISVPVHSFAS LSLKTTVPEM EPLQDSSK MVLIRTIETR**  
 DGEKVVTEQ KEQHSDDLKSIHSY

**Figura 40.** Cobertura de los péptidos asignados sobre la secuencia de periferina. Se muestra la secuencia aminoacídica completa de periferina, y marcados en rojo aquellas zonas cubiertas por los péptidos asignados en el análisis mediante espectrometría de masas. Estos péptidos abarcan 220 aminoácidos, que cubren un 46,3% del total de la secuencia de la proteína.

En base a estos resultados, se identificó la periferina como el antígeno reconocido por el hibridoma 228E1.

De hecho, como se puede observar en la figura 5, en los inmunoblots se detectan una serie de spots, todos ellos del mismo peso molecular, pero con pequeñas diferencias en el punto isoeléctrico. Esto se debe, en el caso de la periferina, y como ya habían descrito otros autores anteriormente, a modificaciones post-traduccionales de la misma proteína.

Siguiendo con la metodología de inmunoblot, sobre extractos proteicos separados mediante electroforesis bidimensional, se comprobó también que al utilizar el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma 228E1 sobre muestras procedentes de la línea de insulinoma NIT-1, se detectaba el mismo spot.

De la misma manera, siguiendo con los extractos de neuroblastoma separados en geles bidimensionales, las inmunodetecciones realizadas con el sobrenadante de cultivo de otros hibridomas del mismo grupo, en todos los casos resultaron en la detección del mismo spot.

Estos resultados, en conjunto, indicaban que todos los anticuerpos monoclonales estudiados, que ya habían sido reclasificados con patrón de reconocimiento neuroendocrino, podrían estar reconociendo específicamente periferina, un antígeno neuroendocrino, que forma filamentos intermedios. De esta manera se explicaría también por qué en las tinciones mediante inmunofluorescencia no se había detectado la presencia del antígeno en los islotes pancreáticos, ya que se ha descrito que la expresión de periferina en células beta pancreáticas de animales adultos es muy débil.

#### 4. CARACTERIZACIÓN DEL RECONOCIMIENTO DIFERENCIAL DE LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE PERIFERINA

Periferina es una proteína que forma filamentos intermedios. Como todas las proteínas de esta familia, está formada por un dominio central (*rod*), bastante conservado entre los diferentes tipos de filamentos intermedios, que forma la estructura denominada "*coiled-coil*" característica de este tipo de proteínas. Esta región central está franqueada por los extremos amino- (*head*) y carboxi-terminal (*tail*), donde se localizan las zonas diferenciales entre las diferentes proteínas de esta familia (Fig. 41).

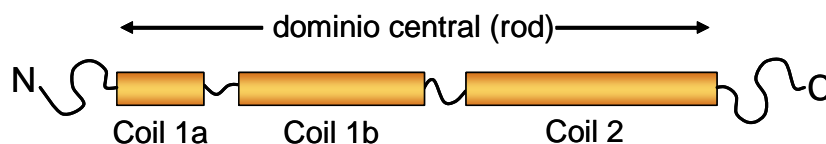


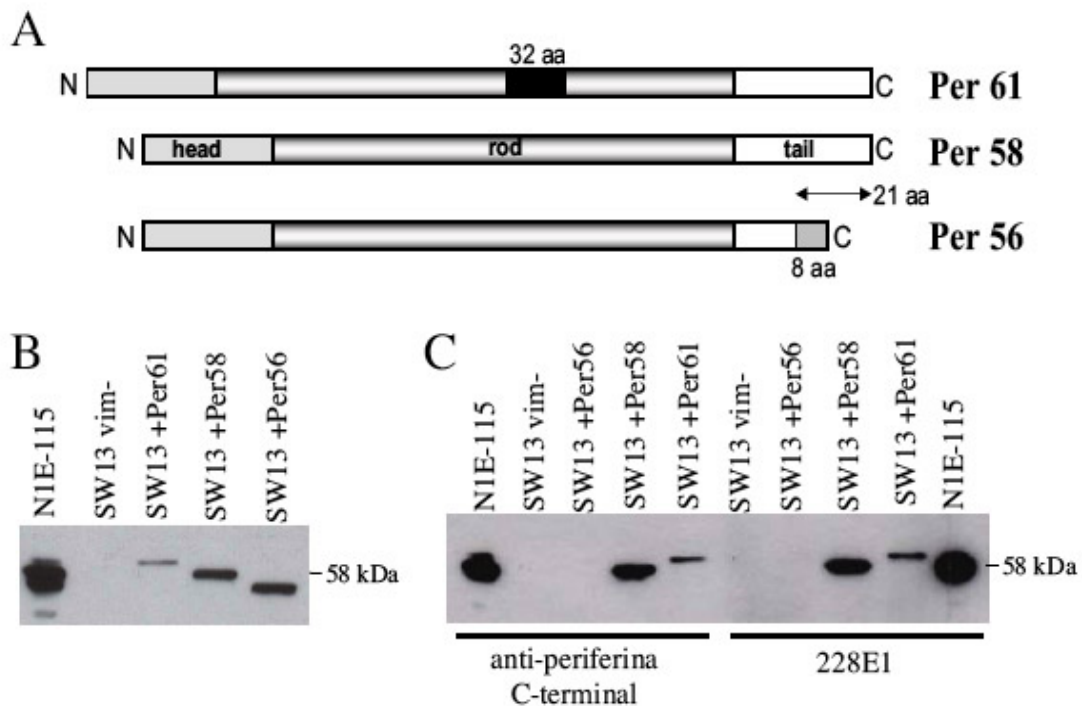
Figura 41. Representación gráfica de la estructura de la periferina.

Aunque sólo existe un gen que codifica para periferina, en ratón se han descrito, a nivel proteico, tres isoformas de periferina, que se generan mediante splicing alternativo del RNA mensajero [Landon et al., 1989]. La forma más común, denominada Per58, resultado del correcto splicing de todos los intrones, tiene un peso molecular de 58kDa y es la que se expresa mayoritariamente (Fig. 42-A). La isoforma Per61, originada por el splicing defectivo del intrón 4, contiene una inserción de 32 aminoácidos, lo cual le confiere un peso molecular de 61kDa. La isoforma Per56, denominada también así por su peso molecular, tiene una región carboxi-terminal más corta, debido a una deleción y cambio de pauta de lectura en el último exón, que origina un cambio en la secuencia final de la proteína. Estas dos últimas isoformas, Per61 y Per56, se expresan en menor medida [Landon et al., 2000].

En los ensayos realizados mediante Western blot, con los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas, se detectaba en general una sola banda correspondiente al antígeno (Fig.35). Existía la posibilidad de que realmente estos anticuerpos sólo fueran capaces de reconocer una de las isoformas de la periferina. No obstante, también podía ocurrir que la isoforma detectada fuera la mayoritaria en todas las muestras, y que el resto de isoformas, aún siendo posibles antígenos para estos anticuerpos, no fuesen detectados a causa de su bajo nivel de expresión. Con el objetivo de conocer si éstos anticuerpos reconocen una o varias isoformas de periferina, se indujo la expresión de cada una de las isoformas de forma ectópica en una línea celular, para poderlas analizar de forma individualizada.

Se utilizó la línea SW13 vim(-) para la transfección de las diferentes isoformas de periferina. Esta línea celular de carcinoma adrenal se caracteriza por un déficit de expresión de vimentina; estas células no presentan estructura interna de filamentos intermedios, ya que tampoco producen ningún otro tipo de proteínas de esta familia. Sobre estas células se realizó la transfección transitoria de los diferentes plásmidos conteniendo la secuencia de cDNA correspondiente a cada una de las 3 isoformas de periferina, bajo el promotor de citomegalovirus, constitutivo y de alta expresión en mamíferos [Robertson et al., 2003].

Dos días después de la transfección de la línea celular SW13 vim(-), con los diferentes plásmidos, correspondientes a cada una de las isoformas de periferina, los cultivos fueron recogidos y con ellos se realizó una extracción fraccionada de proteínas, tal como se había procedido en los estudios anteriores. La fracción correspondiente a las proteínas de citoesqueleto (F4), de cada uno de los cultivos, fue analizada mediante Western blot, utilizando un anticuerpo comercial policlonal contra periferina, para comprobar la correcta producción de las diferentes isoformas de periferina. De esta manera se comprobó que, en cada uno de los cultivos, se producía la isoforma de periferina esperada (Fig. 42-B).



**Figura 42.** Caracterización del reconocimiento diferencial de las isoformas de periferina. **A.** Representación gráfica de las tres isoformas de periferina, generadas por splicing alternativos. Per58 es la forma mayoritaria; Per61 presenta una adición de 32 aa entre los exones 4 y 5; Per56 resulta del uso de un sitio aceptor críptico en el inicio del exón 9, que conlleva una deleción y cambio del marco de lectura, que modifica la secuencia C-terminal de 21 aa por una secuencia diferente de 8 aa. **B.** Confirmación, mediante Western blot utilizando un anticuerpo comercial policlonal específico para periferina, de la correcta producción de las diferentes isoformas de periferina, en los cultivos de SW13 vim(-) transfectados. Como control negativo, se analizó una muestra de la misma línea celular, sin transfectar. Se utilizó extracto F4 de la línea de neuroblastoma N1E-115 como control positivo, con la posible expresión de las tres isoformas de periferina. **C.** Western blot de los extractos F4 procedentes de las diferentes líneas transfectantes, revelados con el sobrenadante del cultivo del hibridoma 228E1, y un anticuerpo comercial anti-periferina generado contra un péptido C-terminal, respectivamente.

Cuando se llevó a cabo el mismo ensayo de Western blot, pero utilizando el sobrenadante de cultivo del hibridoma 228E1 como anticuerpo primario en la inmunodetección, se detectó su interacción con las isoformas Per58 y Per61, mientras que la isoforma Per56 no fue detectada (Fig. 42-C). Teniendo en cuenta las diferencias estructurales que diferencian las tres isoformas, un anticuerpo monoclonal que pueda unirse a las isoformas Per58 y Per61, pero no a Per56, debe estar reconociendo un epítipo localizado en el extremo carboxi-terminal de la proteína, en la zona donde se encuentra el cambio de secuencia característico de Per56.



Siguiendo esta hipótesis, se repitió el ensayo de inmunodetección, esta vez incubando la membrana con un anticuerpo comercial policlonal anti-periferina generado contra un péptido localizado en el extremo C-terminal de la proteína. En este caso, el patrón de detección de las diferentes isoformas fue el mismo que se ha descrito para el anticuerpo monoclonal 228E1.

De la misma manera, se determinó el patrón de reconocimiento de las tres isoformas de periferina, para el resto de hibridomas con patrón neuroendocrino. En total, de los 21 hibridomas estudiados, 20 reconocen sólo las isoformas Per58 y Per61, mientras que sólo un hibridoma puede reconocer indistintamente las tres isoformas de periferina (Tabla 17).

**Tabla 17.** Lista de hibridomas con patrón neuroendocrino, y patrón de reconocimiento, de cada uno de ellos, sobre las diferentes isoformas de periferina.

<b>HIBRIDOMA</b>	<b>Per56</b>	<b>Per58</b>	<b>Per61</b>
228E1	-	+	+
184F6	-	+	+
263B	-	+	+
161A	-	+	+
258A	-	+	+
259B	-	+	+
293A	+	+	+
260D	-	+	+
39C1	-	+	+
I6	-	+	+
36B	-	+	+
182B1	-	+	+
35A	-	+	+
246A3AA	-	+	+
280A	-	+	+
186A	-	+	+
271F3A	-	+	+
135A	-	+	+
170B1B	-	+	+
166I	-	+	+
400A1	-	+	+

Con estos resultados, por un lado, se comprobó que el antígeno reconocido por todos los hibridomas clasificados con patrón neuroendocrino es la periferina; en ningún caso se detectó la unión de los anticuerpos a proteínas presentes en el extracto F4 de la línea celular SW13 vim(-) sin transfectar, mientras que en todos ellos se detectó la banda correspondiente en los extractos de cultivos transfectados con Per58 y Per61.

#### IV. Resultados / 2

En conjunto, estos resultados indican que la gran mayoría de los anticuerpos monoclonales estudiados (20/21) reconocen un epítipo lineal localizado en el extremo carboxi-terminal de la periferina. Por el contrario, sólo uno de ellos reconoce un epítipo localizado en otra zona de la proteína, conservada en las tres isoformas.



## V. DISCUSIÓN



## 1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LOS LINFOCITOS B INFILTRANTES EN ISLOTES PANCREÁTICOS

Numerosos estudios realizados en los últimos años sugieren un papel determinante de los linfocitos B sobre la regulación de los linfocitos T efectores, en la respuesta autoinmunitaria contra las células beta pancreáticas. Algunos de ellos, señalan a la población de linfocitos B como principal responsable de la expansión de la respuesta T autorreactiva contra autoantígenos, actuando como "segunda señal" activadora de los linfocitos T efectores. Otras aproximaciones experimentales, por el contrario, evidencian la capacidad de los propios linfocitos B para inhibir la proliferación y activación de los linfocitos T responsables del ataque autoinmunitario. La mayor parte de estos estudios han analizado poblaciones linfocitarias periféricas (sobre todo bazo y ganglios linfáticos pancreáticos). De hecho, los modelos murinos basados en deficiencias o transgenes, abarcan la población global de linfocitos B de los individuos. Sin embargo, poco se ha estudiado hasta el momento, sobre la población de linfocitos B que migra hasta el páncreas para pasar a formar parte del infiltrado que invade los islotes. Por esta razón el objetivo principal de nuestro estudio ha sido caracterizar fenotípicamente y funcionalmente la población de linfocitos B que se encuentra infiltrando los islotes pancreáticos, ya desde fases tempranas de la diabetes, en el modelo murino NOD de diabetes autoinmunitaria espontánea.

Para detectar peculiaridades fenotípicas y/o funcionales distintivas de la población de linfocitos B infiltrantes, ésta ha sido comparada, a lo largo de todo el estudio, con otras poblaciones de linfocitos B periféricos, especialmente esplénicos. Esto podía comportar ciertos problemas de interpretación y comparación de los resultados con otros autores, ya que se ha descrito que la población de linfocitos B periféricos de NOD, por ser una cepa con susceptibilidad al desarrollo de procesos autoinmunitarios, puede presentar diferencias respecto al fenotipo descrito en cepas control sanas. Por esta razón, en primer lugar, y para delimitar los parámetros que consideraríamos "normales" dentro de la población de linfocitos B en animales NOD, se ha realizado un estudio de los linfocitos B que se encuentran en órganos linfoides secundarios, tomando como referencia el bazo. Al comparar los resultados obtenidos en las cepas NOD (susceptible a diabetes), NOR (homólogo resistente) y BALB/c (cepa control), se han encontrado diferencias significativas en los linfocitos B periféricos, fundamentalmente entre las cepas con background genético de predisposición a procesos autoinmunitarios (NOD y NOR) y la cepa control.

De acuerdo con lo clásicamente descrito en diferentes cepas murinas, el 95% de los linfocitos B esplénicos presentan inmunoglobulina de membrana con isotipo IgM y/o IgD. Pero, al analizar las diferentes subpoblaciones de células B esplénicas, en función de los niveles de expresión relativos de ambos isotipos [según clasificación descrita en Carseti et al., 2004], se

ha observado que en los animales NOD, se presenta un aumento significativo en el porcentaje relativo de células con fenotipo  $IgM^{high}IgD^{low}$ , que se ve compensado por una disminución en la proporción de células maduras ( $IgM^{low}IgD^{high}$ ). Consideramos que este aumento corresponde con células B de zona marginal. De hecho, otros autores ya habían descrito un aumento relativo de linfocitos B correspondientes a zona marginal, en animales NOD, en comparación con la cepa B6 [Silveira et al., 2004]. Las células B de zona marginal derivan de linfocitos B transicionales T2 y/o linfocitos B-2 maduros, y se caracterizan por la producción de anticuerpos naturales y capacidad de respuesta frente a antígenos T-independientes [Cariappa et al., 2002]. Estas funciones y el bajo umbral de activación presente en estas células las asemeja a las células B-1, abundantes en las cavidades intraperitoneal y pleural, compartiendo así con ellas la función de primera línea de defensa humoral innata ante patógenos [Mebius et al., 2005]. No obstante, se ha demostrado que las células B de zona marginal también tienen una importante capacidad para estimular células T CD4+ de forma antígeno-específica [Martin et al., 2002]. Se postula que las células B de zona marginal podrían originarse tras una interacción de baja afinidad de linfocitos B transicionales T2 con autoantígenos [Pillai et al., 2005]; así, un defecto en los mecanismos de tolerancia periférica en los linfocitos B de ratones NOD, que dificultaría la delección clonal o anergia de las células autorreactivas, podría ser el causante del aumento de la población de linfocitos B de zona marginal [Silveira et al., 2004]. En estas condiciones, podría considerarse a las células B de zona marginal como APCs potencialmente diabetogénicas [Silveira et al., 2006]. En cambio, en la cepa NOR la disminución en la proporción de linfocitos B maduros se ve compensado con un aumento en el compartimento de linfocitos B transicionales T2. Esto podría indicar que, en estos animales, sí que están actuando mecanismos de tolerancia como el bloqueo de la maduración o la delección de clones autorreactivos.

Se ha observado también, que el porcentaje de linfocitos B esplénicos que presentan expresión del marcador CD5 en superficie es significativamente mayor en las cepas con predisposición autoinmunitaria. Mientras que el porcentaje de células CD19+CD5+ en el bazo de la cepa control BALB/c representa menos de un 10% de la población total de linfocitos B, la proporción hallada en las cepas NOD y NOR es del 25-30%. El marcador de superficie CD5 es una proteína de 67kD, perteneciente a la familia de receptores depuradores (*scavenger receptors*), con funciones de señalización, que además de encontrarse constitutivamente expresada en linfocitos T y timocitos, se puede detectar en la subpoblación de linfocitos B denominada B-1a. La población de linfocitos B denominada B-1 (a diferencia de la población B-2, más frecuente en periferia) ha sido clásicamente identificada por su localización intraperitoneal, por tener una aparición temprana durante el desarrollo fetal/neonatal, y por mantener su número en la vida adulta gracias a su propia capacidad de autorregeneración. Las inmunoglobulinas producidas por estas células, principalmente de tipo IgM, y que son denominados "anticuerpos naturales", presentan poca variabilidad en la región V, y reconocen

polisacáridos de origen bacteriano, aunque también presentan reacción cruzada con cierta variedad de autoantígenos (principalmente de naturaleza glicoproteica). Esta población B-1 se caracteriza fenotípicamente por la expresión de CD11b (Mac-1, marcador típico de macrófagos) y bajos niveles de expresión de B220 en superficie. La población de linfocitos B-1 se divide a su vez en las subpoblaciones B-1b y B-1a, caracterizada esta última por la expresión diferencial de CD5 en superficie. Se ha observado que la capacidad de reconocimiento de autoantígenos es especialmente frecuente en la subpoblación B-1a, por lo que se cree que la aparición en superficie de CD5 podría ser inducida, tras el encuentro del linfocito B con su autoantígeno específico. [Hayakawa et al., 2000]. Sin embargo, la población de células B CD5+ que nosotros encontramos en el bazo de los animales NOD y NOR no encajan dentro de la descripción fenotípica característica de las células B-1a, ya que no presentan expresión de CD11b. De hecho, la población CD19+CD5+ residente en órganos linfoides secundarios ha sido recientemente denominada como "células B CD5+ inducidas"; se ha visto que éstas se encuentran principalmente en la zona del manto folicular de los centros germinales y se ha comprobado que la región V de sus inmunoglobulinas no son tan restringidas como en el caso de las células B-1a típicas [Youinou et al., 1999]. Según la hipótesis de la "expansión clonal" propuesta por Clarke et al. [Clarke et al., 1998], este fenotipo CD5+ sería el resultante de un proceso de diferenciación a partir de células B-2 maduras, denominadas en este caso B-0, y que se localizan en los folículos esplénicos, durante la expansión clonal estimulada por el antígeno. De esta manera, se postula que, potencialmente, cualquier célula B, recientemente generada, podría adquirir fenotipo CD5+, si el antígeno media el entrecruzamiento de varios receptores BCR (IgM). Así, si un autoantígeno es capaz de unirse al linfocito B de forma multivalente, y la señal producida es suficientemente fuerte como para promover la supervivencia de esta célula, pero demasiado débil como para inducir deleción, se daría un proceso de inducción de la expresión en membrana de la molécula CD5 [Wortis et al., 2001; Su et al., 2000]. No obstante, la molécula CD5 expresada como consecuencia de esta diferenciación podría tener una función diferente a la que presenta en células de origen B-1a. La función típicamente asignada a CD5 en células B-1a es la de coestimulación a través de su ligando CD72, presente en todas las células B [Youinou et al., 1999]. Contrariamente, en estas células B CD5+ inducidas, la principal acción de CD5 parece ser la de regular negativamente la señalización vía BCR, así como inhibir la proliferación, favoreciendo en cambio la apoptosis de la propia célula [Hippen et al., 2000]. De esta manera, éstas células CD5+ quedarían en un estado de anergia tras haber interactuado con el antígeno (probablemente autoantígeno). Se ha observado que el número de células B CD5+ está aumentado en varias enfermedades autoinmunitarias humanas, como es el caso de la artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, tiroiditis autoinmunitaria y esclerosis múltiple [Talal et al., 1992]. Asimismo, también se ha detectado un incremento en la proliferación de células B CD5+ en cepas murinas con predisposición autoinmunitaria, como es el caso del ratón NZB [Hayakawa et al., 2000]. Nuestros datos obtenidos en bazo de ratones de las cepas NOD y

## V. Discusión

NOR podrían pues, tener relación con este aumento en el número de células B CD5+ "inducidas" que se ha observado en otros casos relacionados con autoinmunidad. Sin embargo, no se ha podido confirmar el papel que podría estar desempeñando esta población de células B CD5+ en las patologías autoinmunitarias, y si puede haber alguna relación con la pérdida de tolerancia en éstas células.

El aumento en la expresión del marcador de maduración CD24, que se ha observado en la población de linfocitos B esplénicos de animales NOD y NOR, en comparación con los niveles detectados en la cepa control BALB/c, podría estar asociado con la formación de centros germinales [Shinall et al., 2000], dentro del proceso de desarrollo de la respuesta de tipo autoinmunitaria. En estudios anteriores ya se ha descrito la formación de centros germinales en el bazo de cepas de ratón con predisposición autoinmunitaria, entre ellos el ratón NOD [Luzina et al., 2001]. La formación de centros germinales en el bazo de estos animales, desde el primer mes de vida, se correlaciona con la aparición, también a edades tempranas, de autoanticuerpos en suero. Puesto que en nuestro caso, las colonias de animales han sido mantenidas en una unidad SPF, en los animales no se desarrollan respuestas inmunitarias frente a patógenos. De esta manera, es razonable que la activación por parte de los linfocitos B, que observamos en el bazo de los animales NOD y NOR, sea reflejo del desarrollo de una respuesta autoinmunitaria, que no se presenta en la cepa BALB/c.

También se ha observado que en las dos cepas con predisposición a procesos autoinmunitarios (NOD y NOR) los linfocitos B esplénicos presentan un mayor grado de expresión de la molécula CD19 en superficie. La molécula CD19 forma parte, junto con CD21 y CD81, del complejo correceptor de los linfocitos B. Dentro del complejo, CD21 es la subunidad que se une directamente a la fracción C3b del complemento, mientras que CD19 es la subunidad transmisora de la señal a nivel intracelular. La función del complejo CD19/CD21 es, por tanto, la de amplificar la señalización inducida a través del BCR, frente a antígenos opsonizados por complemento [Cherukuri et al., 2001]. CD19 resulta un marcador de autoinmunidad en otros modelos de estudio: en modelos transgénicos de hiperexpresión de CD19 tiene lugar una elevada producción de autoanticuerpos [Sato et al., 1996; Inaoki et al., 1997]. Esta particularidad ha sido también observada previamente en algunas patologías humanas como el caso de la esclerosis sistémica, en que se ha observado un incremento del 20% en los niveles de expresión de CD19 en la población de linfocitos B periféricos de los pacientes [Sato et al., 2000; Tuscano et al., 2003]. Se postula que la hiperexpresión de CD19 en los linfocitos B alteraría el umbral de activación y resultaría en una hiperactivación de los mismos [Tuscano et al., 2002]. De la misma manera, esta hiperexpresión de CD19 en los linfocitos B de animales NOD y NOR, podría ser también un marcador de autoinmunidad.

Por otro lado, se conoce que es necesaria la intervención de la molécula CD19 para que tenga lugar la inducción de la expresión de CD5 en linfocitos B. De hecho, se ha demostrado



que CD19 es imprescindible para el desarrollo y mantenimiento de la población B-1 [Fearon et al., 2000]. Aunque otros grupos han estudiado la relación entre los niveles de expresión de CD19 y el desarrollo de procesos autoinmunitarios, tanto en modelos animales transgénicos como en muestras de pacientes, no se ha encontrado una relación proporcional directa con el número de células B CD5+ en periferia.

Además de estas características, el aumento significativo de otros marcadores de activación como CD24, CD44 y MHC de clase I, en las dos cepas con predisposición a autoinmunidad, indican que en estos casos los linfocitos B están siendo activados y éstos, a su vez, podrán potenciar la activación de linfocitos T. Estudios de otros autores, en que comparaban linfocitos B esplénicos de individuos NOD con animales control B6, habían encontrado una mayor expresión de CD19, CD21, MHC de clase II y CD40 en los primeros, con lo cual también se les atribuyó una mayor capacidad para cooperar en la activación de linfocitos T [Moore et al. 2005]. También la observación de un mayor porcentaje de linfocitos B CD69+ en el bazo de las cepas NOD y NOR apoya la hipótesis de la hiperactivación de los linfocitos B en estas cepas [Hussain et al., 2004].

En conjunto, estos datos sugieren que los linfocitos B periféricos de las cepas NOD y NOR presentan características fenotípicas que sugieren un mayor grado de activación que los procedentes de cepas control como BALB/c, a la vez que muestran signos claramente relacionados con autoinmunidad. Puesto que la mayoría de estas características son compartidas por la cepa NOR resistente a la diabetes, éstas estarían relacionadas más bien con el desarrollo de respuestas de tipo autoinmunitaria en general, aunque no estrictamente con la destrucción de las células beta pancreáticas. No obstante, datos de otros autores sugieren la existencia de diferencias funcionales (intrínsecas o adquiridas) entre los linfocitos B de las cepas NOD y NOR, puesto que la reconstitución de animales carentes de células B NOD.Ig $\mu^{\text{null}}$  con linfocitos B procedentes de animales NOR inducen diabetes con menor incidencia que en los individuos reconstituidos con linfocitos B de NOD [Serreze and Silveira, 2003].

Por otro lado, en este estudio, a partir del análisis histopatológico de muestras de páncreas procedentes de animales NOD de diferentes edades, se ha comprobado que la población de linfocitos B no es la mayoritaria en el infiltrado pancreático. Por el contrario, y como ya había sido descrito en otros trabajos anteriores, la población de linfocitos T CD4+ es la más abundante. No obstante, se ha observado que dentro de la masa celular que compone el infiltrado, los linfocitos B y T, tanto CD4+ como CD8+, se encuentran en contacto directo unos con otros. Este contacto célula-célula permitiría la interacción directa entre los diferentes tipos celulares.

Mediante el análisis cuantitativo de la población de linfocitos B realizada mediante citometría de flujo, se comprobó que la proporción de linfocitos B infiltrantes evoluciona a medida que avanza la insulinitis. De hecho, la máxima proporción de linfocitos B infiltrantes (>40%) se observa a las doce semanas de edad, y en mayor grado en hembras (tanto en la cepa susceptible NOD como la control F1, resistente a la diabetes). Esto sugiere que en ese momento, justo antes del debut clínico, la población de células B puede estar teniendo un papel más destacado. Sin embargo, y aunque probablemente esté relacionado con la susceptibilidad al desarrollo de la diabetes, puesto que se encuentra mayor proporción de linfocitos B en los páncreas correspondientes a hembras, esto no parece ser un factor determinante en la aparición final de la enfermedad, ya que la incidencia de ésta en hembras F1 es muy baja. Esta evolución, no se observa de forma paralela en las poblaciones periféricas correspondientes a bazo y ganglios linfáticos. Puesto que se ha comprobado también que el aumento de proporción de linfocitos B en el infiltrado no se ve acompañado por un proceso de proliferación "in situ", las variaciones observadas en las proporciones relativas de las diferentes poblaciones linfocitarias infiltrantes son probablemente debidas a cambios en el patrón de migración leucocitaria en distintas fases del desarrollo de la insulinitis.

Los resultados negativos obtenidos en el análisis de la proliferación "in situ" de los linfocitos B infiltrantes hacen descartar la posibilidad de existan estructuras de centro germinal dentro del infiltrado. De hecho, los resultados del análisis histológico, comentado anteriormente, ya indicaban que no existe una localización diferencial de los linfocitos T y B, dentro del tejido pancreático. Algunos autores han descrito la presencia de vénulas de endotelio alto y la expresión de quimiocinas propias de tejido linfoide, dentro del tejido pancreático infiltrado de los ratones NOD [Faveeuw et al., 1994; Hjelmström et al., 2000, Bistrup et al., 2004]. Sin embargo no se ha podido confirmar la generación ectópica de estructuras linfoides terciarias, caracterizadas por la generación de folículos de células B rodeados de zonas T, observadas en otras patologías de tipo autoinmunitario órgano-específicas como la artritis reumatoide, la tiroiditis o la EAE [Aloisi et al, 2006].

Además de estar poco representada, la población de linfocitos B infiltrantes en las primeras fases del infiltrado de los islotes pancreáticos (5-7 semanas) se muestra fenotípicamente más variada, mientras que en etapas más avanzadas (9-12 semanas) la población presenta un fenotipo considerablemente homogéneo. Por esta razón, en este estudio la población de linfocitos B infiltrados se ha analizado en su globalidad en hembras de 12 semanas de edad.

A partir de los resultados obtenidos en el estudio de expresión en membrana de los diferentes isotipos de inmunoglobulina, se deduce que la población de linfocitos B infiltrantes está mayormente formada por linfocitos B maduros (no se observan las poblaciones correspondientes a formas transicionales y linfocitos B de zona marginal), de forma similar a lo que se encuentra a nivel de ganglios linfáticos regionales. Este dato, además, se ve

confirmado por un menor nivel de expresión de CD24 en la población infiltrante. Teniendo en cuenta, además, que el 90% de los linfocitos B infiltrantes son IgD positivos, cabe descartar la posibilidad de que nos encontremos ante una población de linfocitos B memoria, en su mayoría. Se trata pues de una población de linfocitos B, que no provienen de una reacción de centro germinal.

En cuanto a la presencia de células B CD5+ dentro del infiltrado, no se han detectado diferencias significativas en cuanto a la proporción hallada en poblaciones periféricas de éstos mismos animales. Esto contrasta con los datos publicados por Kendall et al. [Kendall et al., 2004] en los que se describía una considerable acumulación de células B-1 (CD19+CD5+CD11b+) en el infiltrado de los islotes pancreáticos de animales NOD, y además con un papel aparentemente decisivo en el desarrollo de la insulinitis y la diabetes. Nosotros, al igual que otros grupos [Hussain et al., 2005], no hemos encontrado células que presenten en este fenotipo formando parte del infiltrado pancreático.

La característica fenotípica más peculiar, hallada exclusivamente en la población de linfocitos B infiltrantes de islotes, es la disminución de la expresión en membrana de la molécula CD19, componente del complejo correceptor. Este descenso en los niveles de expresión de CD19 es más significativo a medida que avanza la edad, encontrándose los valores mínimos en hembras de 12 semanas. El descenso de la expresión en superficie, de CD19, es característico del proceso de diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas [Calame et al., 2003]. Durante este proceso, se ha descrito también el descenso de otras moléculas de superficie como CD45R/B220, CD21, CD22, CD40, MHC de clase II e incluso el propio BCR, [McHeyzer-Williams et al., 2005]. Puesto que estas características no son compartidas con los linfocitos B infiltrantes, se descartó que el descenso de CD19 fuera indicador de un estado de diferenciación a células plasmáticas. No obstante, se consideró la posibilidad de que esta característica fenotípica estuviese indicando que nos encontrábamos ante células B anérgicas, puesto que sí se ha descrito la disminución de la expresión de CD21, también componente del correceptor, como indicador de anergia en células B [Noorchashm et al., 1999b]. La anergia es un mecanismo de tolerancia periférica de los linfocitos B frente al reconocimiento de un autoantígeno, mediante el cual las células quedan funcionalmente silenciadas [Rojas et al., 2001]. De forma general, los linfocitos B anérgicos se caracterizan por la incapacidad de proliferar y de aumentar la expresión de moléculas coestimuladoras en su superficie [Eris et al., 1994; Rathmell et al., 1998]. Según el autoantígeno y grado de afinidad con el que éste es reconocido por las células B se han definido diversos fenotipos correspondientes a células anérgicas. En un modelo murino transgénico con linfocitos B específicos anti-DNA, el estado de anergia se describió que se caracterizaba por una disminución de la expresión de CD21, IgM, CD22, CD23, CD40, CD20 y L-selectina, así como por un aumento en la detección de HSA (CD24), CD44 y MHC de clase II [Noorchashm et al., 1999b]. Desafortunadamente,

## V. Discusión

algunos de los marcadores mencionados anteriormente, para los cuales disponíamos de un anticuerpo monoclonal específico para su análisis por citometría, no han podido ser estudiados, ya que su detección en muestras de páncreas se veía alterada como consecuencia del proceso de digestión con la enzima colagenasa (CD21, CD44). Sin embargo, en los marcadores que sí han podido ser analizados, como es el caso de CD40 e IgM, no se han encontrado diferencias significativas con respecto al nivel de expresión en linfocitos B esplénicos. Aunque sí que se observó una mayor expresión de moléculas de MHC de clase II, se detectó en cambio un descenso en la expresión de CD24. Así pues, el fenotipo global observado en la población de linfocitos B infiltrantes no encaja con esta descripción de anergia.

Recientemente se ha descrito también el papel regulador de CD19 sobre la captación y procesamiento de antígeno. CD19 fue descrito inicialmente como parte del correceptor de BCR, cuya función es proporcionar señales que sinergizan con la vía de señalización del propio BCR; pero se ha visto que, debido a que la molécula de MHC de clase II comparte con el BCR algunos elementos de la vía de señalización, CD19 también puede tener influencia sobre esta vía [Bobbit et al., 2000]. De hecho, CD19 tiene un efecto regulador sobre el proceso de endocitosis del antígeno, así como sobre su posterior procesamiento y direccionamiento hacia el encuentro con las moléculas de MHC de clase II. El efecto sobre la vía de presentación de antígeno puede ser activador o inhibidor (actuando como feed-back negativo), dependiendo de la señal y la intensidad que reciba el CD19 [Wagle et al., 2000]. Es muy probable, por tanto, que el descenso en la expresión de CD19 en la población de linfocitos B infiltrantes tenga algún tipo de repercusión sobre la presentación de antígeno vía MHC de clase II.

De hecho los datos observados en las muestras procedentes de islotes pancreáticos revelan que la población de linfocitos B infiltrantes presenta, en su conjunto, un aumento significativo en comparación con las células B esplénicas, en los niveles de expresión en membrana de las moléculas presentadoras de antígeno, tanto las que corresponden a MHC de clase I (H-2kd) como a clase II (I-A<sup>97</sup>). Este aumento en la capacidad de presentación de antígeno en esta población de linfocitos B, contrasta con la ausencia de moléculas coestimuladoras (B7-2) en la superficie de la mayoría de los mismos (aunque hay más linfocitos B que expresan CD86 en la población infiltrante, éstos representan menos de un 10% del total de la población). En estas condiciones, estos linfocitos B pueden presentar antígenos a células T, pero no aportar las señales coestimuladoras necesarias para su completa activación; más bien, al contrario, el efecto sobre células T naive sería de tipo tolerizante [Porakishvili et al., 2001; Eynon et al., 1993; Fuchs et al., 1992]. Otros grupos han señalado la supresión de la molécula coestimuladora B7-2 como respuesta de los linfocitos B autorreactivos que se ven sometidos a una exposición crónica al antígeno, resultando así en un estado de tolerancia [Rathmell et al.,

1998]. Es probable pues, que los linfocitos B que encontramos a nivel del infiltrado pancreático sean autorreactivos y hayan estado ya en contacto con su antígeno específico, y que como resultado de esta exposición hayan desarrollado un fenotipo de tipo tolerizante. En ese caso la función que estarían llevando a cabo los linfocitos B en islote sería la de actuar como freno ante el ataque de los linfocitos T a las células beta pancreáticas. Este papel por parte de los linfocitos B podría explicar el hecho de que sea precisamente a las 12 semanas de edad, justo antes del debut clínico, cuando se observa una proporción más importante de linfocitos B dentro del infiltrado pancreático; este momento es decisivo de cara a la destrucción final de la población de células beta del islote por parte de los linfocitos T, o a la permanencia de un infiltrado de tipo "benigno".

Nuestros resultados contrastan con los descritos por otros autores [Hussain et al., 2004; Hussain et al., 2005] en que analizan mediante citometría de flujo el fenotipo de la población de linfocitos B infiltrantes de islotes; en estos estudios se describió que el 80% de estas células expresan B7-2 y el 25% CD69. Aunque en nuestros estudios también hemos encontrado que el porcentaje de linfocitos B que expresan B7-2 y/o CD69 en el infiltrado es mayor que en la población esplénica, éstos sólo representan un 10% de la población total. En nuestro caso, hemos tenido especial cuidado en mantener el fenotipo original de los linfocitos infiltrantes y por ello se realizó el análisis fenotípico de forma inmediata tras la digestión del páncreas con colagenasa y recolección de los islotes, aunque ello nos ha conllevado la pérdida de información correspondiente a aquellos marcadores de superficie que quedaban afectados tras la digestión enzimática. En cambio, en los estudios referenciados, el análisis fenotípico se realizó, en todos los casos, tras dejar los islotes en cultivo durante una noche; es posible que la discordancia observada en los resultados sea consecuencia de la diferencia en la metodología utilizada en los diferentes estudios.

Puesto que los linfocitos B infiltrantes de islotes parecen ser células que han tenido un contacto previo con su correspondiente autoantígeno y, aunque no muestran fenotipo característico de anergia, parecen presentar un estado funcional "silenciado", se consideró oportuno analizar la posible producción diferencial de citoquinas por parte de esta población. Puesto que se conoce que el patrón de citoquinas producidas por las células B puede desviar la respuesta hacia Th1 o Th2 [Harris et al., 2000], se analizó, mediante tinción intracelular, la posible producción de IFN $\gamma$  e IL-4. Por otra parte, dado que se han descrito poblaciones de células B reguladoras que producen IL-10 con función reguladora de la respuesta autoinmunitaria en modelos murinos de enfermedades como la EAE y la inflamación intestinal crónica [Moore et al., 2001; Fillatreau et al., 2002; Mizoguchi et al., 2002; Mauri et al., 2003], la producción de esta citoquina también fue analizada. Aunque un 3% de los linfocitos B infiltrantes son productores de IFN $\gamma$  y un 1% lo son de IL-10, estos datos no presentan ninguna diferencia significativa con los observados en la población de linfocitos B esplénicos. Cabe

destacar que, una vez más, la metodología utilizada para la detección de citoquinas a nivel intracelular fue concebida con el objetivo de mantener las condiciones naturales de los linfocitos B infiltrantes, razón por la cual la activación *in vitro* de los cultivos de islotes sólo se mantuvo durante 5 horas. Aunque éste protocolo puede limitar en cierta medida la detección de citoquinas que se produzcan en baja cantidad, reproduce lo más fielmente posible el estado original de los linfocitos infiltrantes. Otros autores han descrito la producción diferencial de TNF $\alpha$ , una citoquina con función pro-inflamatoria, en la población de linfocitos B infiltrantes [Hussain et al., 2005], pero de nuevo en este caso la detección se había realizado tras al menos 12 horas de cultivo de los islotes.

Los ensayos de estimulación "in vitro" de linfocitos B procedentes de infiltrado pancreático aquí descritos, se realizaron con el objetivo de conocer el estado funcional de esta población celular, con la intención de discernir la posible existencia de un estado funcional "silenciado" similar a la anergia. En este punto, es destacable la observación de variaciones en el fenotipo adquirido por los cultivos no sometidos al efecto de agentes estimuladores; el fenotipo de los linfocitos B en cultivo sólo con medio de cultivo completo (MCC) presenta ciertas modificaciones ya a las 24 horas de cultivo, especialmente en el caso de los linfocitos procedentes de islotes, en que los niveles de CD19 se ven aumentados hasta asemejarse a los detectados en células esplénicas. También se detectan cambios, en especial en los linfocitos que proceden del ambiente intransular, en cuanto a la expresión de MHC de clase I y B7-2. Teniendo en cuenta estos cambios, ésta puede ser, en parte, una explicación al hecho de que otros autores habían descrito un fenotipo claramente activador en los linfocitos B infiltrantes de islotes [Hussain et al., 2005]; como se ha comentado anteriormente, en esos estudios las muestras eran cultivadas toda una noche para revertir los efectos de la digestión con colagenasa. Nosotros hipotetizamos que, dentro del infiltrado intransular, existe un microambiente influenciado en alto grado por la secreción local de citoquinas, que mantiene a los linfocitos B en un estado "silenciado", caracterizado principalmente por la reducida expresión de CD19. Cuando los islotes son puestos en cultivo, aún en ausencia de estímulos activadores, las células tienden a salir del espacio intransular y quedan en suspensión en el medio de cultivo. En esta situación es posible que se pierda el efecto que el microambiente pudiera ejercer sobre las células infiltrantes. Precisamente por esta razón, en este estudio se ha realizado siempre el fenotipado de los linfocitos B lo más rápidamente posible, tras el aislamiento de los islotes. Mediante esta metodología, el fenotipo analizado mediante citometría de flujo, en lo que en este estudio se ha denominado tiempo "cero", es más fiel al que realmente se encuentra en las células dentro del infiltrado.

Los resultados obtenidos en la estimulación con LPS hacen descartar la posibilidad de un estado funcional similar a la anergia en las poblaciones celulares estudiadas, ya que tanto sobre linfocitos B esplénicos o procedentes de infiltrado pancreático, se ve favorecida la

proliferación en todos los casos y, a más largo plazo, la diferenciación de estas células hacia un fenotipo secretor de anticuerpos (datos no mostrados) [Noorchashm et al., 1999b]. De hecho, incluso algunos autores han descrito que los linfocitos B infiltrantes de islotes pancreáticos tienen mayor capacidad de proliferación que los linfocitos esplénicos, procedentes de animales NOD, cuando son estimulados “in vitro” [Hussain et al., 2004]. Nuestros resultados también evidenciaron que los linfocitos B infiltrantes, al igual que los procedentes de bazo, pueden responder a la estimulación con LPS aumentando la expresión de moléculas coestimuladoras (B7-2), lo cual tampoco es propio de linfocitos B anérgicos [Eris et al., 1994].

Por otro lado, la reversión del estado de tolerancia en células B, en presencia de anti-CD40+IL-4, ya había sido descrita anteriormente por otros grupos, siendo especialmente concluyente la potenciación de la expresión de B7-2 [Rathmell et al., 1998; Eris et al., 1994; Acevedo-Suárez et al., 2005]. De hecho, algunos autores han demostrado que las células B anérgicas, en el modelo murino NOD son especialmente reversibles frente a la estimulación con anti-CD40 [Silveira et al., 2004]. Sin embargo, según nuestros resultados, mientras que los linfocitos B esplénicos han respondido al estímulo con anti-CD40+IL-4 de forma similar que lo hacían al estímulo con LPS, los linfocitos B procedentes del infiltrado pancreático han mostrado un fenotipo activado especialmente destacable en el caso de la estimulación con anti-CD40+IL-4. De hecho, los linfocitos B infiltrantes de islote responden, tras un estímulo de 48 horas con anti-CD40+IL-4, con un aumento significativamente superior en la expresión de moléculas presentadoras de MHC de clase I y II, así como de la molécula coestimuladora B7-2, de los marcadores de activación CD69 y CD44, implicado también éste último en fenómenos de migración. Estos resultados, por un lado, apoyan la hipótesis de que estos linfocitos B infiltrantes, en efecto, no son equivalentes a los que encontramos en periferia a nivel de bazo, sino que ya han estado en contacto con su antígeno. Por otro lado, se ve confirmada la existencia de un estado de “silenciamiento” de estos linfocitos dentro de los islotes, que puede ser revertido con LPS e incluso se puede potenciar un estado de hiperactivación mediante la estimulación con anti-CD40+IL-4, obteniendo así un fenotipo de tipo APC. Aunque no se muestra en los resultados, se comprobó que este efecto también se obtenía tras la estimulación sólo con anti-CD40. Aunque ya se ha descrito que la activación *in vitro* de linfocitos B naive con anti-CD40 es capaz de promover la adopción de capacidades activadoras de antígeno, como la hiperexpresión de moléculas del MHC y de moléculas coestimuladoras [van Kooten et al., 1997], se conoce también que es necesario la adición de otros estímulos (citoquinas, ligandos de TLRs) para que el fenotipo presentador de antígeno sea completamente activado [Schultze et al., 2004]. El hecho de que los linfocitos B procedentes del infiltrado tengan una mayor capacidad para ser activadas mediante CD40 sugiere que éstas células no son células B naive, sino que, al contrario, ya han tenido algún encuentro con su antígeno, lo cual las ha condicionado. Estos ensayos de estimulación *in vitro*

con anti-CD40 fueron reproducidos utilizando muestras de linfocitos B previamente purificadas mediante sorting (datos no mostrados): en este caso también se observó la mayor susceptibilidad de los linfocitos B infiltrantes para activarse y adoptar capacidades presentadoras de antígeno. Estos resultados confirman que las diferencias observadas no se deben al efecto de otros tipos celulares presentes en los cultivos (linfocitos T, macrófagos, células dendríticas, células beta pancreáticas portadoras de potenciales autoantígenos), sino que es una característica intrínseca de los propios linfocitos B.

Para poder tener un mayor conocimiento sobre la verdadera funcionalidad de los linfocitos B infiltrantes de islotes, se llevaron a cabo una serie de ensayos en los que, tras la purificación de las diferentes poblaciones celulares mediante sorting, se analizó la capacidad de los linfocitos B para estimular la proliferación policlonal de linfocitos T. Para ello se marcaron los linfocitos T a nivel intracelular con CFSE, de manera que la pérdida de fluorescencia en cada división celular sirvió para monitorizar la proliferación en esta población celular. Esta técnica permite el seguimiento de la proliferación policlonal de una población seleccionada aunque esta última sea poco abundante, pero no sería indicada para registrar el crecimiento lento de líneas monoclonales. En primer lugar, se observó que los linfocitos B por sí mismos, tanto procedentes de islotes como de bazo, son incapaces de inducir la proliferación policlonal de los linfocitos T. Por otro lado, tampoco son capaces de inhibir una proliferación inducida mediante anti-CD3 ligado a placa. Estos resultados hacen descartar la posibilidad de que estas poblaciones de linfocitos B estén produciendo alguna citoquina con efecto directo sobre la estimulación policlonal de los linfocitos T. Por otro lado, también se estudió la posible capacidad de las diferentes poblaciones de linfocitos B para actuar como células accesorias: se conoce que los linfocitos B esplénicos, al igual que otras poblaciones celulares con función APC, pueden inducir la proliferación policlonal de linfocitos T si se añade al medio anti-CD3 soluble (el anti-CD3 soluble por sí mismo no es capaz de activar a los linfocitos T, ya que es necesario que esté anclado a una superficie). En este caso, se ha observado que los linfocitos B procedentes de infiltrado pancreático también muestran la misma capacidad para funcionar como células accesorias facilitando la proliferación de los linfocitos T, en la misma medida que lo hacen los linfocitos B esplénicos. Este resultado no mostró diferencias aún con la adición de anti-CD40 al cultivo, aunque ya habíamos comprobado que este estímulo confería a los linfocitos B procedentes de infiltrado un fenotipo claramente presentador-activador, lo cual hace pensar que, definitivamente, el posible efecto de los linfocitos B infiltrantes sobre la población de linfocitos T no debe tener carácter policlonal. Por esta razón se suplementaron también los cultivos con extractos de islotes, para facilitar la interacción directa entre las células B y T a través del acoplamiento de la molécula de MHC y el TCR, respectivamente. Aún así, no fue posible observar ninguna diferencia significativa, entre las poblaciones de linfocitos B infiltrantes y esplénicos, y tampoco utilizando linfocitos T procedentes de infiltrado pancreático o de bazo. Esto podría estar indicando que el extracto de islotes aplicado al cultivo no funciona



como antígeno para la mayor parte de la población celular; lo cual sugiere una diversidad en el reconocimiento antigénico, dentro del infiltrado, mayor de la esperada.

Estos resultados contrastan con los datos reportados por el grupo del Dr. Delovitch en los que se describe una mayor capacidad estimuladora de los linfocitos B infiltrantes, para estimular la proliferación de los linfocitos T [Hussain et al., 2005]. Esos estudios de proliferación se realizaron también sobre cocultivos (linfocitos B + linfocitos T), analizando la proliferación mediante la medición de la incorporación de timidina tritiada. En ese caso, y puesto que no indica que se haya sometido la población de linfocitos B a irradiación, es posible que parte de la proliferación detectada mediante el contaje radiactivo se deba a la proliferación de la propia población de los linfocitos B. En nuestros ensayos, en cambio, monitorizamos específicamente la proliferación de los linfocitos T (purificados mediante sorting antes de ser marcados con CFSE).

Así pues, mediante las técnicas utilizadas para la detección de producción de citoquinas y para analizar la capacidad de estimulación de la proliferación policlonal de linfocitos T, no hemos podido detectar ninguna característica funcional diferencial en la población de linfocitos B infiltrantes de islotes en los animales NOD estudiados, aunque el fenotipo a tiempo cero, y tras la estimulación *in vitro* con anti-CD40, muestra claramente que se encuentran en un estado funcional “silenciado” que puede ser revertido para convertirse en un fenotipo claramente presentador y activador.

Finalmente, cabe destacar que no hemos encontrado diferencias significativas, ni a nivel fenotípico ni a nivel funcional entre las poblaciones de linfocitos B infiltrantes entre individuos NOD y F1, lo que hace pensar que esta población celular no es definitiva de un infiltrado con carácter “efector” *versus* “benigno”.

## 2. IDENTIFICACIÓN DE LA PERIFERINA COMO EL AUTOANTÍGENO NEUROENDOCRINO RECONOCIDO DE FORMA PREDOMINANTE POR LOS LINFOCITOS B INFILTRANTES EN ISLOTES

En este estudio se han caracterizado 21 hibridomas, que habían sido generados mediante la fusión de linfocitos B infiltrantes en islotes pancreáticos con células de la línea de mieloma NS-1. Estos hibridomas habían sido clasificados, según resultados previos obtenidos mediante inmunofluorescencia sobre tejido, con un patrón de reconocimiento neuronal, representando el patrón mayoritario (53%) en el total de hibridomas obtenidos. Sin embargo, mediante la utilización de técnicas con mayor sensibilidad como la inmunodetección mediante quimioluminiscencia, hemos podido comprobar que todos estos anticuerpos reconocen periferina, una proteína de distribución neuroendocrina.

Periferina es una proteína que forma filamentos intermedios [Portier et al., 1983-84]. Como todas las proteínas de esta familia, consta de una región central muy conservada que forma la estructura denominada *coiled-coil*, mantenida por conformaciones de hélice- $\beta$ , y que es la responsable de la polimerización necesaria para formar la estructura de filamento intermedio [Lariviere et al., 2004]. Esta región central está flanqueada por los extremos amino y carboxi-terminal, que es donde se localizan las diferencias estructurales que diferencian los diversos tipos de filamentos intermedios. A nivel estructural la periferina se clasifica dentro de los filamentos intermedios de clase III, junto a la vimentina y la desmina, pero su patrón de expresión tisular es exclusivo: periferina se expresa típicamente en neuronas del sistema nervioso periférico, y en algunos grupos de neuronas del sistema nervioso central, como motoneuronas de la médula espinal, nervios de origen sensorial y pequeñas interneuronas en la corteza y el hipocampo. No obstante, también se ha descrito su expresión a nivel endocrino, en células beta pancreáticas productoras de insulina, y especialmente en líneas celulares derivadas de insulinoma [Ecurat et al., 1991]. Sin embargo, mediante técnicas de inmunofluorescencia no es posible detectar la presencia de periferina en islotes pancreáticos de individuos adultos, lo cual se ha interpretado como un reflejo del bajo nivel de expresión “*in vivo*” en el tejido maduro. Esto explicaría el hecho de que los hibridomas aquí estudiados hubieran sido clasificados previamente con patrón estrictamente neuronal, en función de los resultados obtenidos mediante técnicas de inmunofluorescencia, cuando en realidad reconocen un antígeno de origen neuroendocrino.

De hecho, periferina fue caracterizada como autoantígeno neuroendocrino asociado a diabetes tipo 1 en ratones NOD en 1992 [Boitard et al., 1992], cuando se demostró que estos animales, a partir de las 6 semanas de edad presentan niveles detectables de autoanticuerpos en suero y respuesta de tipo T contra periferina, mientras que esta circunstancia no se presenta en otras

cepas no susceptibles a la diabetes autoinmunitaria. A partir de este estudio, fue generada una línea monoclonal de hibridoma específica también para periferina, que mostraba evidencias en la región V de la inmunoglobulina que delataban una maduración de la afinidad y selección vía antígeno [Pleau et al., 1993]. Pero, en ese caso, el hibridoma había sido generado mediante la fusión de células esplénicas de animales NOD con células de mieloma. Sin embargo nadie, hasta el momento, había descrito la presencia de esta especificidad, y menos aún en tan alta proporción, en los linfocitos B que infiltran los islotes pancreáticos. De hecho, según nuestros resultados, esta es la población más representada en el infiltrado, incluso mayor que la población de linfocitos B anti-insulina o anti-GAD. Estos resultados abren la incógnita de por qué los linfocitos B específicos para periferina son preferencialmente atraídos al foco de inflamación intransular.

Se ha descrito que la molécula de periferina puede ser reconocida por anticuerpos específicos para moléculas de MHC de clase II, concretamente los que reconocen el haplotipo I-A<sup>g7</sup>, característico de la cepa NOD [Boitard et al., 1992]. Esta circunstancia sugería la existencia de un epítipo, compartido por la molécula I-A<sup>g7</sup> y periferina, responsable de la reactividad cruzada. Este fenómeno también ha sido descrito en el caso de otro autoantígeno neuroendocrino, GAD-65, para el cual se ha identificado un epítipo para células T que presenta un alto grado de semejanza aminoacídica con un péptido de I-A<sup>g7</sup> [Xu et al., 1999]. Esta particularidad ha sido propuesta como posible causante de la selección positiva, a nivel tímico, de células T autoreactivas, gracias a su interacción con moléculas del MHC de clase II que pueden presentar mimetismo molecular con autoantígenos. Sin embargo, a nivel de respuesta de linfocitos B autorreactivos no se ha demostrado que se esté produciendo el mismo fenómeno de mimetismo molecular. De hecho, nosotros también hemos realizado pruebas de inmunodetección con los 21 anticuerpos monoclonales estudiados para detectar el posible reconocimiento cruzado con la propia molécula de MHC de clase II (datos no mostrados) pero en ningún caso se ha observado un resultado positivo. De hecho, la mayoría de los hibridomas caracterizados (20/21) parece que reconocen un epítipo lineal que se localiza en el extremo carboxi-terminal de la secuencia peptídica de la periferina, y esta zona no muestra ninguna homología secuencial con I-A<sup>g7</sup>, ni con ningún otro filamento intermedio. Cabe destacar, por otra parte, que la respuesta T contra el autoantígeno GAD65 se ha descrito que también, en las fases iniciales, está restringida a la región C-terminal [Kaufman et al., 1993].

Está bien establecido que los niveles de expresión de periferina, a diferencia de otros neurofilamentos, es inducible en situaciones de inflamación, mediada por citoquinas pro-inflamatorias del tipo IL-6 [Sterneck et al., 1996], así como en situaciones de regeneración postraumática [Troy et al., 1990]. De hecho ha sido demostrado que periferina tiene un papel determinante en el desarrollo y regeneración neuronal [Lariviere et al., 2004]. Teniendo en

cuenta estos datos, nosotros hipotetizamos que la remodelación del sistema nervioso simpático que tiene lugar, de forma fisiológica, en el páncreas de los ratones de 3 semanas de edad [Durant et al., 2003], puede favorecer unos altos niveles de expresión de periferina en estas fibras nerviosas. Además, teniendo en cuenta que se ha descrito un defecto intrínseco en las capacidades fagocíticas de los macrófagos en animales de la cepa NOD [O'Brien et al., 2002], que potencia la aparición de una reacción inflamatoria incipiente en las zonas adyacentes a las fibras nerviosas, se podría ver potenciada aún más la expresión de periferina. De hecho, se ha observado que las zonas peri-insulares y ductales, precisamente donde se localizan las fibras nerviosas pancreáticas, es donde se inicia el proceso de insulinitis, y no en el interior de los islotes pancreáticos [Durant et al., 2003; Homo-Delarche et al., 2004a]. Esta situación favorecería la presentación de autoantígenos de origen neuronal a células T autoreactivas y, entre ellos, la periferina. Siguiendo con la hipótesis propuesta por la de la Dra.Homo-Delarche [Saravia et al., 2003; Homo-Delarche, 2004b], la amplificación de la respuesta autoinmunitaria, por parte de los propios linfocitos T autorreactivos, implicaría la afectación de las fibras nerviosas así como el inicio del infiltrado intransular. En este punto, resultaría crucial la presencia de linfocitos T autorreactivos contra antígenos neuroendocrinos (I-A2, GAD, S100 $\beta$ , periferina), favoreciendo así también la destrucción de las células beta pancreáticas. En este contexto autorreactivo, se ha podido observar la hiperactividad e intento de regeneración, tanto por parte del sistema nervioso como de la masa celular beta. Estos mecanismos, cuya función es mantener y/o recuperar la funcionalidad tisular, pueden favorecer la liberación de autoantígenos que normalmente no son expuestos a las células autoreactivas, lo cual podría potenciar aún más la respuesta efectora autoinmunitaria.

La familia de proteínas Reg, entre ellas HIP/PAP, Reg1 y Reg2, son factores de crecimiento con acción autocrina y paracrina, implicados en la regeneración de las células beta pancreáticas. Al igual que periferina, los genes que codifican estas proteínas también son inducibles por citoquinas inflamatorias como IL-6. En pacientes diabéticos, se ha descrito la hiperexpresión de HIP/PAP a nivel endocrino [Gurr et al., 2002]. Asimismo, se ha demostrado que la hiperexpresión de Reg2, en el páncreas de ratones NOD, presenta una marcada correlación con el posterior desarrollo de diabetes [Baeza et al., 1996; Baeza et al., 1997, Sanchez et al, 2000]. Por otro lado se ha descrito que estas proteínas son moléculas diana para respuesta autoinmunitaria, en los individuos afectados de T1D. Así, HIP/PAP ha sido descrita como autoantígeno para la respuesta de tipo T en ratones NOD desde las 4 semanas de vida [Gurr et al., 2002]. En cuanto a la respuesta humoral, se ha detectado la presencia de anticuerpos específicos para proteínas de la familia Reg en un 25% de los pacientes con T1D [Shervani et al., 2004]. Estos datos apoyan la hipótesis de que la autorreactividad contra elementos implicados en procesos regenerativos pueden favorecer un proceso de potenciación, cuando el tejido intenta recuperarse del daño sufrido, acelerando aún más el desarrollo de la diabetes.

En cuanto a la regeneración del tejido nervioso, se ha observado la remodelación de la inervación intransular en la fase de insulitis en los ratones NOD [Persson-Sjögren et al., 2005]. Este proceso de remodelación tisular implica procesos de destrucción de fibras nerviosas, así como procesos regenerativos. Por otro lado, en los islotes pancreáticos de ratones NOD de 4 semanas de edad, se observa una hiperexpresión de citoquinas proinflamatorias del tipo IFN $\gamma$  e IL-6 [Aspord et al., 2004]. Con estos datos, nosotros hipotetizamos que, al igual que ocurre con otros factores regenerativos de células beta, la periferina también puede encontrarse hiperexpresada como consecuencia de esta remodelación y del inicio de la inflamación local. Este hecho podría estar directamente relacionado con el desarrollo de la respuesta autoinmunitaria dirigida contra periferina, descrita a partir de las seis semanas, en el modelo murino NOD [Boitard et al., 1992].

De hecho, se ha demostrado que la destrucción celular durante la fase de insulitis no es exclusiva de células beta productoras de insulina, como se había descrito clásicamente, sino que también se ven afectados otros tipos celulares: se ha observado que el proceso de destrucción de la masa celular beta se ve acompañado, en la rata BB, por la desaparición de la inervación simpática de los islotes [Mei et al., 2002]. Asimismo, se ha descrito la desaparición de las células de Schwann que envuelven los islotes (equivalentes a las células gliales del sistema nervioso central) en etapas iniciales de la insulitis en los ratones NOD, incluso antes de que la destrucción de células beta pancreáticas sea evidente [Winer et al., 2003]. Se ha descrito que las células beta son una fuente primordial de factores de crecimiento para la inervación, tales como NGF (*nerve growth factor*) [Myersen et al., 1996; Rosenbaum et al., 1998]. No obstante, es poco probable que la pérdida de la masa celular beta sea la única causa de la afectación de la inervación insular, puesto que éstos factores de crecimiento sólo son requeridos tras una lesión neuronal [Donnerer, 1996]. De hecho, se ha demostrado que la destrucción de las células beta, mediante el efecto tóxico directo de la estreptozotocina, no repercute en la inervación pancreática, lo cual sugiere una necesaria implicación del infiltrado intransular en esta afectación [Mei et al., 2002]. Cabe tener en cuenta, en cambio, que algunas citoquinas, propias del ambiente proinflamatorio intransular, como IL-1, sí que pueden tener un efecto neurotóxico directo [Zhu, 1997]. Así, el daño neuropático inicial de las citoquinas en la fase inicial de la insulitis, podría potenciar el requerimiento de factores de crecimiento neuronales [Mei et al., 2002]. En esta situación, sí que podría ser crucial la afectación de las células beta en la afectación de la inervación insular [Teitelman et al., 1998].

Aunque no se conoce con exactitud, la implicación directa de la respuesta autorreactiva, en la destrucción de la inervación de los islotes pancreáticos, lo cierto es que esta respuesta es muy destacable por la diversidad de autoantígenos neuroendocrinos descritos, algunos de los cuales, como GAD65, S100 $\beta$ , y la propia periferina, son expresados, de manera claramente preferencial, en elementos del sistema nervioso.

## V. Discusión

A pesar de que en este estudio se ha descrito la prevalencia de linfocitos B anti-periferina en el infiltrado que invade los islotes pancreáticos, no podemos concluir que éstas células estén promoviendo la respuesta autoinmunitaria. De hecho, 15 de los 21 hibridomas analizados se caracterizan por la producción de anticuerpos monoclonales con isotipo IgG2b, el cual se asocia con respuestas inmunoregulatoras de tipo  $T_H3$ . Estos datos sugieren que estas células B infiltrantes específicas para periferina, cuando tomaron contacto con el antígeno, recibieron algún estímulo (posiblemente  $TGF\beta$ ) de tipo  $T_H3$ , por parte de linfocitos T reguladores. De hecho, cabe resaltar que la mayoría de estos hibridomas fueron obtenidos de fusiones de células infiltrantes de islotes procedentes de animales F1(NODxNOR), resistentes a la diabetes [Carrillo et al., 2005]. Así, los linfocitos B infiltrantes específicos para periferina aparecen de forma preferente en insulitis benignas, en las que no se produce una destrucción de la masa celular beta. Estos datos pueden indicar una relación de estos linfocitos B con un efecto anti-diabetogénico.

En contrapartida con los datos obtenidos a partir de estudios realizados con el modelo murino NOD, no existen datos publicados acerca de la respuesta anti-periferina en pacientes afectados de Diabetes de Tipo 1. Aunque otros autoantígenos de origen neuroendocrino como GAD e IA-2 han sido bien descritos y, de hecho, ampliamente utilizados con aplicación diagnóstica, no se han realizado estudios sobre periferina en este campo. De hecho, puesto que a principios de los años 90 se describió que la respuesta de linfocitos T y B contra GAD, en ratones NOD, es patente ya a las 4 semanas de edad, antes de que se puedan detectar respuesta autoinmunitaria contra periferina y otros autoantígenos (6 semanas de edad), se concluyó que GAD debía ser el autoantígeno inicial responsable del desarrollo del ataque autoinmunitario en la diabetes [Tisch et al., 1993; Kaufman et al., 1993]. Además, experimentos en los que la administración intratímica de GAD65 prevenía la aparición de insulitis y diabetes en animales NOD [Tisch et al., 1993], contribuyeron a que la mayoría de estudios sobre el modelo NOD y con muestras de pacientes humanos fueran orientados al estudio de la respuesta anti-GAD, en detrimento del estudio de otros autoantígenos. Además, en el caso de la periferina, la dificultad técnica de trabajar con una proteína altamente insoluble, ha dificultado el uso de este autoantígeno en los procedimientos experimentales. En este aspecto, el hallazgo de que la mayoría de hibridomas caracterizados en este estudio están dirigidos contra el extremo C-terminal de la secuencia peptídica de la periferina abre la posibilidad de utilizar péptidos solubles, en futuros estudios.

Además de la respuesta autoinmunitaria contra las fibras nerviosas que inervan el páncreas, cabe la pena destacar que en un porcentaje importante de los pacientes diabéticos (10-90%, según el criterio de diagnóstico utilizado) se presenta algún tipo de neuropatía [Vinik et al., 2004]; se entiende por neuropatía diabética un conjunto variado de síndromes, que comprenden desde afectaciones subclínicas a diversas manifestaciones clínicas que afectan a

diferentes capacidades sensitivas y/o motoras, dependiendo del tipo de fibra nerviosa afectada. En la mayoría de los casos, estas neuropatías son derivadas del efecto continuado de la hiperglucemia en los pacientes, la cual afecta considerablemente a la microvascularización tisular. No obstante, algunos estudios sugieren que elementos del sistema inmunitario pueden estar implicados en el desarrollo de la neuropatía diabética que afecta al sistema nervioso autónomo, ya que se ha demostrado la presencia de infiltrado inflamatorio, compuesto por linfocitos y macrófagos, en ganglios y haces nerviosos del sistema nervioso autónomo de pacientes afectados [Duchen et al., 1980]. De hecho, en algunos casos se siguen con cierto éxito tratamientos con anti-inflamatorios y/o inmunoglobulina para frenar la progresión de la patología [Krendel et al., 1995; Barada et al., 1999]. Curiosamente, en un modelo transgénico de NOD deficiente para la molécula coestimuladora B7-2, el cual no presenta diabetes, se ha detectado el desarrollo de polineuropatía periférica de origen autoinmunitario, y por tanto no derivada de la hiperglucemia crónica [Salomon et al., 2001]. Algunos grupos han descrito que existe una asociación entre la detección en suero de anticuerpos anti-ganglios simpáticos y anti-nervio vago (también reactivos contra líneas de neuroblastoma) en pacientes diabéticos y el desarrollo de neuropatía autónoma, mientras que estos anticuerpos no son detectables en sueros de pacientes sin neuropatías, aunque sean diabéticos de larga duración, lo que sugiere una relación directa entre ambas condiciones [Zanone et al., 1993; Zanone et al. 2003]. Aunque no se conoce si la respuesta autoinmunitaria contra estos elementos del sistema nervioso autónomo son la causa o la consecuencia de la degeneración neuronal, sí parece que al menos puede ser utilizado como marcador predictivo en pacientes diabéticos de reciente debut con predisposición a presentar este tipo de complicaciones. Hasta el momento algunos grupos ya han corroborado la asociación entre la presencia de anticuerpos anti-GAD65 y disfunciones a nivel de sistema nervioso periférico [Kaufman et al., 1992; Hoeldtke et al., 2000] pero, de nuevo, la posible presencia de anticuerpos anti-periferina en el suero de estos pacientes o de individuos con alta predisposición, resta por evaluar hasta el momento.

Existen otros datos que relacionan la diabetes tipo 1 con la respuesta autoinmunitaria contra elementos del sistema nervioso. Así, se ha descrito que la T1D, dentro de las enfermedades de origen autoinmunitario, guarda una estrecha relación con la esclerosis múltiple (MS). Estas dos patologías presentan cuadros clínicos muy diferentes, puesto que la T1D deriva de la afectación de las células endocrinas responsables de la producción de insulina, mientras que la MS se desarrolla tras la afectación de la sustancia blanca en el sistema nervioso central. Sin embargo, el origen de ambas se encuentra en una reacción autoinmunitaria específica de órgano, causada principalmente por una respuesta T efectora de tipo Th1. Además de presentar una distribución geográfica similar, también se ha descrito la posible influencia de los mismos factores ambientales, como el consumo de leche de vaca, en el desarrollo de ambas enfermedades [Winer et al., 2001a]. Además, se ha descrito una asociación familiar entre la

T1D y la MS, así como una cierta probabilidad de presentarse conjuntamente, en el mismo individuo [Wertman et al., 1991]. Asimismo, también en los modelos animales se observa esta relación; se ha descrito que el ratón NOD, puede ser un buen modelo de estudio de la MS. En otras cepas murinas, para inducir la encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE), es necesaria la administración exógena de un antígeno de mielina acompañado de un adyuvante, para inducir la respuesta autoinmunitaria, junto a la *Toxina Pertussis*, la cual produce una disfunción temporal de la barrera hematoencefálica, facilitando así el acceso de elementos del sistema inmunitario a antígenos exclusivos del sistema nervioso central. En cambio, en ratones NOD, la EAE puede ser inducida mediante la única administración de *Toxina Pertussis*, lo cual indica la pre-existencia de la respuesta autoinmunitaria contra los antígenos de mielina en estos animales [Winer et al., 2001b]. De hecho, se ha descrito en el modelo NOD, así como en pacientes de T1D y MS, y familiares con alto riesgo a presentar estas patologías, una activación de la respuesta autoinmunitaria dirigida indistintamente contra antígenos endocrinos (Insulina, ICA69), neuroendocrinos (I-A2, GAD) y del sistema nervioso central (proteína básica de mielina, proteína proteolípídica) [Winer et al., 2001b]. Estos datos sugieren que los mismos mecanismos de autoinmunidad pueden ser la base de diferentes enfermedades, siendo la susceptibilidad tisular del órgano diana el factor decisivo en la afectación observada, en cada caso.





## VI. CONCLUSIONES



El análisis fenotípico, funcional y antigénico de la población de linfocitos B infiltrantes en islotes pancreáticos realizados en este estudio, permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Los linfocitos B en cepas murinas con susceptibilidad a procesos autoinmunitarios (NOD y NOR), presentan características fenotípicas diferenciales, a nivel de órganos linfoides secundarios, con respecto a cepas control (BALB/c). Estas variaciones rebelan la activación de clones de linfocitos B autorreactivos, dando lugar en algunos casos a la activación de estas células, y en otros a un silenciamiento funcional de la propia célula B mediante la expresión de CD5 y/o desviación hacia un linaje de zona marginal.
- Dentro del infiltrado que invade los islotes pancreáticos, los linfocitos B y T, tanto CD4 como CD8, se hallan distribuidos homogéneamente, teniendo por tanto la posibilidad física de interactuar directamente entre ellos.
- La proporción de linfocitos B que conforman el infiltrado pancreático evoluciona a lo largo a medida que avanza la insulitis, alcanzando su máximo (>40%) en hembras de 12 semanas de edad. Pero los linfocitos B no proliferan dentro ni forman centros germinales, dentro de la estructura del infiltrado.
- Los linfocitos B migran a los islotes pancreáticos influenciados por factores dependientes de género.
- Los linfocitos B infiltrantes en islotes son células maduras que presentan un fenotipo indicador de un estado funcional “silenciado”. Este estado es mantenido por el microambiente del infiltrado intransular.
- La respuesta de los linfocitos B infiltrantes a la activación vía CD40, evidencia que éstos ya han mantenido un contacto previo con el antígeno.
- No hemos encontrado evidencias de diferencias funcionales entre los linfocitos B infiltrantes y los esplénicos, a nivel de producción de citoquinas.
- Los linfocitos B infiltrantes en islotes, por sí mismos, no son capaces de promover “in vitro” la proliferación policlonal de células T, ni aún en presencia de anti-CD40 o extracto de islotes.
- La población de linfocitos B infiltrantes no tiene efecto inhibitor sobre la proliferación policlonal de los linfocitos T, estimulada “in vitro”
- Los linfocitos B infiltrantes en islotes tienen capacidad para ejercer actividad accesoria, al igual que los linfocitos esplénicos, sobre la estimulación de los linfocitos T,

## VI. Conclusiones

- No hemos encontrado diferencias, a nivel de linfocitos B infiltrantes, entre NOD y F1(NODxNOR), lo que sugiere que la diferencia entre infiltrado “benigno” e infiltrado “efector” no viene dada por el fenotipo de los linfocitos B infiltrantes.
- Una fracción predominante de los linfocitos B infiltrantes en islotes pancreáticos reconocen periferina, un autoantígeno de origen neuroendocrino.
- La mayoría de linfocitos B anti-periferina reconocen un determinante antigénico inmunodominante, localizado en el extremo carboxi-terminal de la proteína, presente únicamente en las isoformas Per58 y Per61.



## VII. PUBLICACIONES



**ARTÍCULOS ORIGINALES:**

- Alba A, Puertas MC, Carrillo J, Planas R, Ampudia R, Pastor X, Bosch F, Pujol-Borrell R, Verdaguer J, Vives-Pi M. (2004) IFN $\beta$  accelerates autoimmune Type 1 Diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to  $\beta$  cells in nondiabetes-prone mice. *J Immunology*, 173:6667-6675
- J Carrillo, MC Puertas, A Alba, R Ampudia, X Pastor, R Planas, N Riutort, N Alonso, R Pujol-Borrell, P Santamaria, M Vives-Pi, J Verdaguer. (2005) Islet infiltrating B-lymphocytes in non-obese diabetic mice predominantly target nervous system elements. *Diabetes* 54:69-77
- Puertas MC, Carrillo J, Alba A, Ampudia R, Vives-Pi M, Verdaguer J. The islet-infiltrating B-lymphocytes in non-obese diabetic mice are down-regulated. *Diabetes*, en revisión.
- Puertas MC, Carrillo J, Alba A, Ampudia R, Vives-Pi M, Verdaguer J. Peripherin, a neuroendocrine intermediate filament, is a major autoantigen in islet infiltrating B cells. Artículo en preparación.

**REVISIONES:**

- Verdaguer J, Vives-Pi M, Puertas MC, Carrillo J. (2004) Immunological effectors of beta cell damage in type 1 diabetes. *Inmunología*, 23: 260-268
- J Verdaguer, MC Puertas. La Diabetes tipo 1 como enfermedad mediada por células T. De los modelos animales al ser humano. Capítulo del monográfico *Prediabetes y Diabetes de tipo 1 de reciente diagnóstico*. (2006) Coordinado por I. Conget. Biblioteca de la Sociedad Española de Diabetes. Ediciones Mayo.







## VIII. BIBLIOGRAFÍA



**1. BIBLIOGRAFÍA GENERAL:**

- B Cell Biology in Autoimmunity. (2003) Edited by D. Nemazee. Current Directions in Autoimmunity Series. Karger.
- Fundamental Immunology 5th Edition. (2003) Edited by William E., Md.Paul Eds.. Lippincot Williams & Wilkins Publishers.
- Genes and Genetics of Autoimmunity. (1999) Edited by A.N. Theofilopoulos. Current Directions in Autoimmunity Series. Karger.
- Molecular Biology of B Cells. (2004). Edited by T. Homjo, F. W. Alt, M. Neuberger. Elsevier Academic Press.
- Molecular Pathology of Type 1 Diabetes mellitus. (2001) Edited by M.G. Von Herrath. Current Directions in Autoimmunity Series. Karger.
- Prediabetes y Diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico. (2006) Coordinado por I. Conget. Biblioteca de la Sociedad Española de Diabetes. Ediciones Mayo.

**2. REFERENCIAS:**

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383:787-793
- Ablamunits V, Elias D, Reshef T, Cohen IR. (1998) Islet T cells secreting IFN-gamma in NOD mouse diabetes: arrest by p277 peptide treatment. *J Autoimmun*, 11(1):73-81
- Abulafia-Lapid R, Elias D, Raz I, Keren-Zur Y, Atlan H, Cohen IR. (1999) T cell proliferative responses of type 1 diabetes patients and healthy individuals to human hsp60 and its peptides. *J Autoimmun*, 12:121-129
- *Acevedo-Suárez CA, Hulbert C, Woodward EJ, Thomas JW.* (2005) Uncoupling of anergy from developmental arrest in anti-insulin B cells supports development of autoimmune diabetes. *J Immunol*, 174:827-833
- Achenbach P, Kelemen K, Wegmann DR, Hutton JC. (2002) Spontaneous peripheral T-cell responses to the IA-2 $\beta$  (phogrin) autoantigen in young nonobese diabetic mice. *J Autoimmun*, 19:111-116
- Ahren B. (2000) Autonomic regulation of islet hormone secretion. Implications for health and disease. *Diabetologia*, 43:393-410

## VIII. Bibliografia

- Aichele P, Bachman MF, Hengartner H, Zinkernagel, RM. (1996) Immunopathology of organ-specific autoimmunity as a consequence of virus infection. *Immunol Rev*, 152:21-45
- Akashi T, Nagafuchi S, Anzai K, Kondo S, Kitamura D, Wakana S, Ono J, Kikuchi M, Niho Y, Watanabe T. (1997) Direct evidence for the contribution of B cells to the progression of insulinitis and the development of diabetes in non-obese diabetic mice. *International Immunology*, 9:1159-1164
- Alba A, Planas R, Verdaguer J, Vives-Pi M. (2005) Viral infections and autoimmune diabetes. *Inmunología*, 24(1):33-43
- Alleva DG, Crowe PD, Jin L, Kwok WW, Ling N, Gottschalk M, Conlon PJ, Gottlieb PA, Putnam AL, Gaur A. (2001) A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin. *J Clin Invest*, 107:173-180
- Alleva DG, Gaur A, Jin L, Wegmann D, Gottlieb PA, Pahuja A, Johnson EB, Motheral T, Putnam A, Crowe PD, Ling N, Boehme SA, Conlon PJ. (2002) Immunological characterization and therapeutic activity of an altered-peptide ligand, NBI-6024, based on the immunodominant type 1 diabetes autoantigen -insulin B-chain (9-23) peptide. *Diabetes*, 51(7):2126-2134
- Allman D, Li J, Jardy RR. (1999) Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-DJ recombination. *J Exp Med*, 189:735-740
- Aloisi F, Pujol-Borrell R. (2006) Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev*, 6:205-217
- Amrani A, Serra P, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Verdaguer J, Santamaria P. (2002) CD154-dependent priming of diabetogenic CD4(+) T cells dissociated from activation of antigen-presenting cells. *Immunity*, 16:719-732
- Anderson MS and Bluestone JA. (2005) The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*, 23:447-485
- Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. (2002) Projection of an immunological self-shadow within the thymus by the Aire protein. *Science*, 298:1395-1403
- Anderton SM, Viner NJ, Matharu P, Lowrey PA, Wraith DC. (2002) Influence of a dominant cryptic epitope on autoimmune T tolerance. *Nat Immunol*, 3:175-181
- Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, Clark EA, Smith CA, Grabstein KH, Cosman D, Spriggs MK. (1992) Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*; 357:80-82

- Arndt PA, Leger RM, Garratty G. (1999) Serology of antibodies to second- and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. *Transfusion*, 39:1239-1246
- Aspod C, Rome S, Thivolet C. (2004) Early events in islets and pancreatic lymph nodes in autoimmune diabetes. *J Autoimmun*, 23:27-35
- Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK. (1994) Cellular immunity to a determinant common to glutamic acid decarboxylase and Coxsackie virus in insulin dependent diabetes. *J Clin Invest*, 94:2125-2129
- Atkinson MA, Maclaren NK. (1993) Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*, 92:1608-1616
- Atkinson MA. (2005) Thirty years of investigating the autoimmune basis for type 1 diabetes. Why can't we prevent or reverse this disease? *Diabetes*, 54:1253-1256
- Awata T, Kurihara S, Iitaka M, Takei S, Inoue I, Ishii C, Negishi K, Izumida T, Yoshida Y, Hagura R, Kuzuya N, Kanazawa Y, Katayama S. (1998) Association of CTLA-4 gene A-G polymorphism (IDDM12 locus) with acute-onset and insulin-depleted IDDM as well as autoimmune thyroid disease (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis) in the Japanese population. *Diabetes*, 47:128-129
- Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P. (1990) Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, 347:151-156
- Baeza N, Sanchez D, Vialettes B, Figarella. (1997) Specific reg II gene overexpression in the non-obese diabetic mouse pancreas during active diabetogenesis. *FEBS Lett*, 416(3):364-368
- Baeza NJ, Moriscot CI, Renaud WP, Okamoto H, Figarella CG, Vialettes BH. (1996) Pancreatic regenerating gene overexpression in the nonobese diabetic mouse during active diabetogenesis. *Diabetes*, 45(1):67-70
- Baker FJ, Lee M, Chien YH, Davis MM. (2002) Restricted islet-reactive T cell repertoire of early pancreatic islet infiltrates in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 9374-9379
- Balasa M and Savernick N. (2000) Is pathogenic humoral autoimmunity a Th1 response? Lessons from (for) myasthenia gravis. *Immunol Today*, 21:19-23
- Banatvala JE, Bryant J, Scherthaner G, Borkenstein M, Schober E, Brown D, De Silva LM, Menser MA, Silink M. (1985) 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

## VIII. Bibliografija

- Barada A, Reljanovic M, Milicevic Z, Ljubic S, Car N, Benko B, Inc. A, Metelko Z. (1999) Proximal diabetic neuropathy-response to immunotherapy. *Diabetes*, 48(Suppl 1):A148
- Barker CF, Billingham RE. (1977) Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 332:843-845
- Barthlott T, Kassiotis G, Stockinger B. (2003) T regulation is a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med*, 197:451-460
- Barthold SW. (2004) Unsung heroes in the battle against diabetes. *ILAR J*, 45(3):227-230
- Batista FD, Iber D, Neuberger MS. (2001) B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature*, 411:489-494
- Beales PE, Castri F, Valiant A, Rosignoli G, Buckley L, Pozzilli P. (2002) Adrenalitis in the non-obese diabetic mouse. *Autoimmunity*, 35:329-333
- Behrens GM, Li M, Davey GM, Allison J, Flavell RA, Carbone FR, Heath WR. (2004) Helper requirements for generation of effector CTL to islet beta cell antigens. *J Immunol*, 5420-5426
- Bell GI, Horita S, Karam JH. (1984) A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 33:176-183
- Bell GI, Selby MJ, Rutter WJ. (1982) The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*, 295:31-35
- Bell SE, Goodnow CC. (1994) A selective defect in IgM antigen receptor synthesis and transport causes loss of cell surface IgM expression on tolerant B lymphocytes. *EMBO J*, 13:816-826
- Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. (1995) A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*, 377:630-632
- Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. (1987) Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med*, 166:823-832
- Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pociot F. (1995) Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet*, 9:284-292
- Bertry-Coussot L, Lucas B, Danel C, Halbwachs-Mecarelli L, Bach JF, Chatenoud L, Lemarchand P. (2002) Long-term reversal of established autoimmunity upon transient blockade of the LFA-1/intercellular adhesion molecule-1 pathway. *J Immunol*, 168:3641-3648

- Bezbradica JS, Stanic AK, Matsuki N, Bour-Jordan H, Bluestone JA, Thomas JW, Unutmaz D, Van Kaer L, Joyce S. (2005) Distinct roles of dendritic cells and B cells in Va14Ja18 Natural T cell activation in vivo. *J Immunol*, 174:4696-4705
- Bignon-Laubert A, Boehm B, Lang-Muritano M, Gauthier BR, Brun T, Wollheim CB, Schoenle EJ. (2005) Association of childhood type 1 diabetes mellitus with a variant of PAX4: possible link to beta cell regenerative capacity. *Diabetologia*, 48:900-905
- Birk OS, Elias D, Weiss AS, Rosen A, van-der Zee R, Walker MD, Cohen IR. (1996) NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune cells. *J Autoimmun*, 9:159-166
- Bisikirska BC and Herold KC. (2004) Use of anti-CD3 monoclonal antibody to induce immune regulation in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 1037:1-9
- Bistrup A, Tsay D, Shenoy P, Singer MS, Bangia N, Luther SA, Cyster JG, Ruddle NH, Rosen SD. (2004) Detection of a sulfotransferase (HEC-GlcNAc6ST) in high endothelial venules of lymph nodes and in high endothelial venule-like vessels within ectopic lymphoid aggregates: relationship to the MECA-79 epitope. *Am J Pathol*, 164:1635-1644
- Blomgren SE, Condemi JJ, Vaughan JH. (1972) Procainamide-induced lupus erythematosus. *Am J Med*, 52:338-348
- Bobbitt KR, Justement LB. (2000) Regulation of MHC class II signal transduction by the B cell coreceptors CD19 and CD22. *J Immunol*, 165:5588-5596
- Boitard C, Villa MC, Becourt C, Gia HP, Huc C, Sempe P, Portier MM, Bach JF. (1992) Peripherin: an islet antigen that is cross-reactive with nonobese diabetic mouse class II gene products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:172-176
- Bonifacio E, Atkinson M, Eisenbarth G, Serreze D, Kay TW, Lee-Chan E, Singh B. (2001) International workshop on lessons from animal models for human type 1 diabetes. Identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigen of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, 50:2451-2458
- Borch-Johnsen K, Joner G, Mandrup-Poulsen T, Christy M, Zachau-Christiansen B, Kastrup K, Nerup J. (1984) Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. A hypothesis. *Lancet*, ii:1083-1086
- Boshop GA, Hostager BS. (2001) B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 13:278-285
- Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. (1974) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 2:1279-1283
- 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. (2004) A functional

## VIII. Bibliografia

- variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet*, 36:337-338
- Boudaly S, Morin J, Berthier R, Marche P, Boitard C. (2002) Altered dendritic cells (DC) might be responsible for regulatory T cell imbalance and autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice. *Eur Cytokine Netw*, 13:29-37
  - Bradley BJ, Haskins K, La Rosa FG, Lafferty KJ. (1992) CD8 T cells are not required for islet destruction induced by a CD4+ islet-specific T-cell clone. *Diabetes*, 41:1603-1608
  - Bretscher PA. (1999) A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *PNAS* 96:185
  - Buzzetti R, Quattrocchi CC, Nistico L. (1998) Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence. *Diabetes Metab Rev*, 14: 111-128
  - Bynoe MS, Grimaldi CM, Diamond B. (2000) Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. *PNAS*, 97:2703-2708
  - Calame KL, Lin K-I, Tunyaplin C. (2003) Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol*, 21:205-230.
  - Cameron MJ, Arreaza GA, Grattan M, Meagher C, Sharif S, Burdick MD, Strieter RM, Cook DN, Delovitch TL. (2000) Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type 1 diabetes. *J Immunol*, 165:1102-1110
  - Cardell SL. (2006) The natural killer T lymphocyte: a player in the complex regulation of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol*, 143(2):194-202
  - Cariappa A and Pillai S. (2002) Antigen-dependent B-cell development. *Curr Opin Immunol*, 14: 241
  - Carrillo J, Puertas MC, Alba A, Ampudia RM, Pastor X, Planas R, Riutort N, Alonso N, Pujol-Borrell R, Santamaria P, Vives-Pi M, Verdaguer J. (2005) Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements. *Diabetes*, 54:69-77
  - Carsetti R, Kohler G, Lamers MC. (1995) Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *J Exp Med*, 181:2129-2140
  - Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. (2004) Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 197:179-191



- Carsetti R. (2000) The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *J Exp Med*, 191:5-8
- Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suci-Foca N. (2002) Tolerization of dendritic cells by T<sub>s</sub> cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol*, 3:237-243
- Chao CC, Sytwu HK, Chen EL, Toma J, McDevitt HO. (1999) The role of MHC class II molecules in susceptibility to type 1 diabetes: identification of peptide epitopes and characterization of the T cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:9299-9304
- Chappel CI and Chappel WR. (1983) The discovery and development of the BB rat colony: an animal model of spontaneous diabetes mellitus. *Metabolism*, 32(supplement 1):8-10
- Charre S, Rosmalen JG, Pelegri C, Alves V, Leenen PJ, Drexhage HA, Homo-Delarche F. (2002) Abnormalities in dendritic cell and macrophage accumulation in the pancreas of nonobese diabetic (NOD) mice during the early neonatal period. *Histol Histopathol*, 17:393-401
- Chatenoud L, Salomon B, Bluestone JA. (2001) Suppressor T cells - they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev*, 182:149-163
- Cherukuri A, Cheng PC, Pierce SK. (2001) The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J Immunol*, 167:163-172
- Chiu PP, Serreze DV, Danska JS. (2001) Development and function of diabetogenic T-cells in B-cell-deficient nonobese diabetic mice. *Diabetes*, 50:763-770
- Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. (1993) Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells from diabetic versus prediabetic NOD. NON-Thy-1a donors. *Diabetes*, 42:44-55
- Chung JB, Silverman M, Monroe JG. (2003) Transitional B cells: step by step towards immunocompetence. *Trends Immunol*, 24:343-349
- Clark EA, Ledbetter JA. (1994) How B and T cells talk to each other. *Nature*, 367:425-428
- Clarke SH, Arnold LW. (1998) B-1 cell development: evidence for an uncommitted immunoglobulin (Ig)M<sup>+</sup> B cell precursor in B-1 cell differentiation. *J Exp Med*, 187:1325-1334
- Coleman DL, Kuzawa JE, Leiter EH. (1990) Effect of diet on the incidence of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes*, 39:432-436
- Cornall RJ, Goodnow CC, Cyster JG. (1995) The regulation of self reactive B-cells. *Curr Opin Immunol*, 7:804-811

## VIII. Bibliografia

- Couper JJ, Steele C, Beresford S, Powell T, Mc Caul K, Pollard A, Gellert S, Tait B, Harrison LC, Colman PG. (1999) Lack of association between duration of breast-feeding of introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity. *Diabetes*, 48:2145-2149
- Couper JJ. (2001) Environmental triggers of type 1 diabetes. *J Paediatr Child Health*, 37:218-220
- Cyster JG. (2003) Lymphoid organ development and cell migration. *Immunol Rev*, 195:5-14
- Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris JP. (1984) The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transplantation*, 38:287-292
- Dahlen E, Dawe K, Ohlsson L, Hedlund G. (1998) Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF $\alpha$  in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol*, 160:3585-3593
- Dai YD, Carayanniotis G, Sercarz E. (2005) Antigen processing by autoreactive B cells promotes determinant spreading. *Cell Mol Immunol*, 2(3):169-175
- Darnell RB. (1996) Onconeuronal antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: At the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:4529-4536
- Davidson A, Diamond B. (2001). Autoimmune diseases. *N Engl J Med*, 345(5):340-350
- Delovitch TL, Singh B. (1997) The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity*, 7:727-738
- Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. (1996) Hyperexpression of CD40 ligand by B and T cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody formation. *J Clin Invest*, 97:2063-2073
- Diabetes Epidemiology Research International Group. (1988) Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 37:1113-1119
- Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. (1997) Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*, 3:797-801
- DiLorenzo TP, Graser RT, Ono T, Christianson GJ, Chapman HD, Roopenian DC, Nathanson SG, Serreze DV. (1998) Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent T cell receptor alpha chain gene rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 12538-12543
- Domen RE. (1998) An overview of immune hemolytic anemias. *Cleve Clin J Med*, 65:89-99

- Donaghy M, Rees AJ. (1983) Cigarette smoking and lung haemorrhage in glomerulonephritis caused by autoantibodies to glomerular basement membrane. *Lancet*, 2:1390-1393
- Donnerer J. (1996) Improved neurochemical recovery of 6-hydroxydopamine-lesioned postganglionic sympathetic neurons by nerve growth factor in the adult rat. *Neurosci Lett*, 221:33-36
- Drappa J, Vaishnav AK, Sullivan KE, Chu J-L, Elkin KB. (1996) Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity, *N Engl J Med*, 335:1643-1649
- Duchon LW, Anjorin A, Watkins PJ, Mackay JD. (1980) Pathology of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *Ann Int Med*, 92:301-303
- Durant S, Geutskens S, Van Blokland SC, Coulaud J, Alves V, Pleau JM, Versnel M, Drexhage HA, Homo-Delarche F. (2003) Proapoptosis and antiapoptosis-related molecules during postnatal pancreas development in control and nonobese diabetic mice: Relationship with innervation. *Lab Invest*, 83:227-239
- Dziarski R. (1988) Autoimmunity: polyclonal activation or antigen induction? *Immunol Today*, 9:340-342
- Eisenbarth GS. (2003) Insulin autoimmunity: immunogenetics/immunopathogenesis of type 1A diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 1005:109-118
- Eisenbarth GS. Updated 2005. Animal models of type 1 diabetes: genetics and immunological function. Type 1 diabetes: molecular, cellular, and clinical immunology. Chapter 3. (<http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/eisenbook.html>)
- Encinas JA, Kuchroo VK. (2000) Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol*, 12:691-697
- Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF. (1995) Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity*, 3:39-50
- Eris JM, Basten A, Brink R, Doherty K, Kehry MR, Hodgkin PD. (1994) Anergic self-reactive B cells present self antigen and respond normally to CD40-dependent T-cell signals but are defective in antigen-receptor-mediated functions. *PNAS*, 91:4392-4396
- ERODIAB ACE Study Group. (2000) Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet*, 355:873-876
- Escurat M, Djabali K, Huc C, Landon F, Becourt C, Boitard C, Gros F, Portier MM. (1991) Origin of beta cells of the islets of Langerhans is further questioned by the expression of neuronal intermediate filament proteins, peripherin and NF-L, in the rat insulinoma RIN5F cell line. *Dev Neurosci*, 13(6):424-432

## VIII. Bibliografia

- Eynon EE and Parker DC. (1993) Parameters of tolerance induction by antigen targeted to B lymphocytes. *J Immunol*, 6: 2958-2964
- Faria AM, Weiner HL. (1999) Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv immunol*, 73:153-264
- Faveeuw C, Gagnerault MC, Lepault F. (1994) Expression of homing and adhesion molecules in infiltrated islets of Langerhans and salivary glands of nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 152:5969-5978
- Fearon DT and Carroll MC. (2000) Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Ann Rev Immunol*, 18:393-422
- Feillet H, Bach JF. (2004) On the mechanisms of the protective effect of infections on type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol*, 11:191-194
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. (1996) Rheumatoid arthritis. *Cell*, 85:307-310
- Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. (2002) B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.*, 3:944-950
- Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, Richmond JA, Weir RS. (1986) The histopathology of the pancreas in type 1 diabetes: a 25 year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia*, 29:267-274
- Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ, (1996) Immune regulation by CD40 and its ligand gp30. *Annu Rev Immunol*, 14:591-617
- Fuchs EJ and Matzinger P. (1992) B cells turn off Virgin but not memory T cells. *Science*, 258:1156-1159
- Gagnerault MC, Luan JJ, Lotton C, Lepault F. (2002) Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med*, 196(3):369-377
- Gale EA. (2002) A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia*, 39:500-502
- Gamble DR, Taylor KW. (1969) Seasonal incidence of diabetes mellitus. *BMJ*, 3:631-633
- Garda KC, Teyton L, Wilson IA. (1999) Structural basis of T cell recognition. *Ann Rev Immunol*, 17:369-397
- Garza KM, Chan SM, Suri R, Nguyen LT, Odermatt B, Schoenberger SP, Ohashi PS. (2000) Role of antigen-presenting cells in mediating tolerance and autoimmunity. *J Exp Med*, 191(11):2021-2027
- Gautam AM, Lock CB, Smilek DE, Perason CI, Steinman L, McDevitt HO. (1994) Minimum structural requirements for peptide presentation by major histocompatibility complex class II molecules: implications in induction of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:767-771

- Gepts W (1965) Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus *Diabetes*, 14:619-633
- Gombert JM, Herbelin A, Tancrede-Bohin E, Dy M, Carnaud C, Bach JF. (1996) Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in NOD mice. *Eur J Immunol*, 26:2989-2998
- Goodnow CC, Cyster JG, Hartley SB, Bell SE, Cooke MP, Healy JI, Akkarajun S, Rathmell JC, Pogue SL, Shokat KP. (1995) Self-tolerance checkpoints in B lymphocyte development. *Adv immunol*, 59:279-368
- Goodnow CC. (1996) Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:2264-2271
- Goodnow CC. (2005) Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*, 435:590-597
- Greeley SA, Katsumata M, Yu L, Eisenbarth GS, Moore DJ, Goodarzi H, Barker CF, Najj A, Noorchashm H. (2002) Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Nat Med*, 8(4):399-402
- Greeley SA, Moore DJ, Noorchashm H, Noto LE, Rostami SY, Schlachterman A, Song HK, Koeberlein B, Barker CF, Najj A. (2001) Impaired activation of islet-reactive CD4 T cells in pancreatic lymph nodes of B cell-deficient nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 167:4354-4357
- Green EA and Flavell RA. (1999) The initiation of autoimmune diabetes. *Curr Opin Immunol*, 11:663-669
- Green EA, Wong FS, Eshima K, Mora C, Flavell RA. (2002) Neonatal tumor necrosis factor alpha promotes diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 159:4620-4627
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 270:1189-1192
- Guilherme L, Cunha-Neto E, Coelho V, Snitcowsky R, Pomerantzeff PM, Assis RV, Pedra F, Neumann J, Goldberg A, Patarroyo ME, et al. (1995) Human heart-infiltrating T-cell clones from rheumatic heart disease patients recognize both streptococcal and cardiac proteins. *Circulation*, 92:415-420
- Gurr W, Yavari R, Wen L, Shaw M, Mora C, Christa L, Sherwin RS. (2002) A Reg family protein is overexpressed in islets from a patient with new-onset type 1 diabetes and acts as T-cell autoantigen in NOD mice. *Diabetes*, 51:339-346
- Hammond-Kosack MC, Kilpatrick MW, Docherty K. (1993) The human insulin gene-linked polymorphic region adopts a G-quarted structure in chromatin assembled in vitro. *J Mol Endocrinol*, 10:121-126

## VIII. Bibliografía

- Han S, Hathcock K, Zheng B, Kepler TB, Hodes R, Kelsoe G. (1995) Cellular interaction in germinal centers: roles of CD40 ligand and B7-2 in established germinal centers. *J Immunol*, 155:556-567
- Hanahan D. (1998) Peripheral-antigen-presenting cells in the thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, 10:656-662
- Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. (1991) Resolution and characterization of pro-B and pre-proB cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*, 173:1213-1225
- Hardy RR, Hayakawa K. (2001) B cell development pathways. *Ann Rev Immunol*, 19:595-621
- Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE. (2000) Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol*, 1(6):475-482
- Harris LJ, Larsen SB, McPherson A. (1999) Comparison of intact antibody structures and the implications for the effector functions. *Adv Immunol*, 72:191-208
- Hart DNJ, Fabre JW. (1981) Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med*, 154:347-361
- Hartley SB, Cooke MP, Fulcher DA, Harris AW, Cory S, Basten A, Goodnow CC. (1993) Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell*, 72:325-335
- Haskins K, McDuffie M. (1990) Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet specific T cell clone. *Science*, 249:1433-1436
- Hayakawa K and Hardy RR. (2000) Development and function of B-1 cells. *Curr Opin Immunol*, 12:346-353
- Hayakawa K, Hardy RR, Parks DR, Herzenberg LA. (1983) The 'Ly-1 B' cell subpopulation in normal, immunodeficient and autoimmune mice. *J Exp Med*, 157:202-218
- Herman AE, Tisch RM, Patel SD, Parry SL, Olson J, Noble JA, Cope AP, Cox B, Congia M, McDevitt HO. (1999) Determination of glutamic acid decarboxylase 65 peptides presented by the type 1 diabetes-associated HLA-DQ8 class II molecule identifies an immunogenic peptide motif. *J Immunol*, 163:6275-6282
- Herold KC, Hagopian W, Auger JA, Poumian-Ruiz E, Taylor L, Donaldson D, Gitelman SE, Harlan DM, Xu D, Zivin RA, Bluestone JA. (2002) Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 346:1692-1698
- Herzenberg LA. (2000) B-1 cells: The lineage question revisited. *Immunol Rev*, 175:9-22

- Hippen KL, Tze LE, Behrens TW. (2000) CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J Exp Med*. 191: 883-889
- Hirshhorn JN. (2003) Genetic epidemiology of type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*, 4:87-100
- Hjelmström P, Fjell J, Nakagawa T, Sacca R, Cuff CA, Ruddle NH. (2000) Lymphoid tissue homing chemokines are expressed in chronic inflammation. *Am J Pathol*, 156:1133-1138
- Ho F, Lortan JE, MacLennan ICM, Khan M. (1986) Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *Eur J Immunol*, 16:1297-1301
- Hoeldtke RD, Bryner KD, Hobbs GR, Horvath GG, Riggs JE, Christie I, Ganser G, Marcovina SM, Lernmark A. (2000) Antibodies to glutamic acid decarboxylase and peripheral nerve function in type 1 diabetes. *JCE & M*, 85(9):3297-3308
- Hoglund P, Mintern J, Waltzinger C, Heath W, Benoist C, Mathis D. (1999) Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J Exp Med*, 189(2):331-339
- Holland AM, Gonez JL, Harrison LC. (2004) Progenitor cells in the adult pancreas. *Diabetes Metab Res Rev*, 20:13-27
- Homo-Delarche F, Drexhage HA. (2004a) Immune cells, pancreas development, regeneration and type 1 diabetes. *TRENDS Immunol*, 25(5):222-229
- Homo-Delarche F. (2004b) Neuroendocrine immuno-ontogeny of the pathogenesis of autoimmune diabetes in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *ILAR Journal*, 45(3):237-258
- Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. (1998) Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med*, 4:781-785
- Huang X, Yuang J, Goddard A, Foulis A, James RF, Lernmark A, Pujol-Borrell R, Rabinovitch A, Somoza N, Stewart TA. (1995) Interferon expression in the pancreases of patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 44:658-664
- Huck S, Le Corre R, Youinou P, Zouali M. (2001) Expression of B cell receptor-associated signaling molecules in human lupus. *Autoimmunity*, 33:213-224
- Hulbert C, Riseili B, Rojas M, Thomas JW. (2001) Cutting edge: B cell specificity contributes to the outcome of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 167:5535-5538
- Hussain S and Delovitch TL. (2005) Dysregulated B7-1 and B7-2 expression on nonobese diabetic mouse B cells is associated with increased T cell costimulation and the development of insulinitis. *J Immunol*, 174:680-687

## VIII. Bibliografia

- Hussain S, Salojin KV, Delovitch TL. (2004) Hyperresponsiveness, resistance to B-cell receptor-dependent activation-induced cell death, and accumulation of hyperactivated B-cells in islets is associated with the onset of insulinitis but not Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53:2003-2011
- Ikegami H, Fujisawa T, Makino S, Ogihara T. (2003) Congenic mapping and candidate sequencing of susceptibility genes for Type 1 diabetes in the NOD mouse. *Ann N Y Acad Sci*, 1005:196-204
- Inaoki M, Sato S, Weintraub BC, Goodnow CC, Tedder TF. (1997) CD19-regulating signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes. *J Exp Med*, 186(11):1923-1931
- Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Tamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa A, Tamura S, Inada M, Kawata S, Tauri S, Kono N, Matsuzawa Y. (1993) Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest*, 92:2313-2322
- Jacob J, Kassir R, Kelsoe G. (1991) In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med*, 173:1165-1175
- Jacobsen K, Osmond DG. (1990) Microenvironmental organization and stromal cell associations of B Lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow. *Eur J Immunol*, 20:2395-2404
- Janeway CA Jr. (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, 13:11.
- Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA. (1994) Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes*, 43:667-675
- Jansen A, van Hagen M, Drexhage HA. (1995) Defective maturation and function of antigen-presenting cells in type 1 diabetes. *The Lancet*, 345:491-492
- Jun HS, Yoon JW. (2003) A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 19:8-31
- Kallenberg CG, Brouwer E, Weening JJ, Tervaert JW. (1994) Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int*, 46:1-15



- Kanagawa O, Martin SM, Vaupel BA, Carrasco-Marin E, Unanue ER. (1998) Autoreactivity of T cells from nonobese diabetic mice: an I-Ag7-dependent reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:1721-1724
- Karasuyama H, Rolink A, Melchers F. (1996) Surrogate light chain in B cell development. *Adv Immunol*, 63:1-41
- Karnoven M, Viik-kajander M, Moltchanova E, Libman I, Laporte R, Tuomilehto J. (2000) Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care*, 23:1516-1526
- Katz J, Benoist C, Mathis D. (1993) Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol*, 23:3358-3360
- Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV. (1993) Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature*, 366:69-72
- Kendall PL, Woodward EJ, Hulbert C, Thomas JW. (2004) Peritoneal B cells govern the outcome of diabetes in non-obese diabetic mice. *Eur J Immunol*, 34:2387-2395
- Killeen N, Irving S, Pipping S, Ziegler K. (1998) Signaling check-points during the development of T lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, 10:360-367
- King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. (2004) Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell*, 117:265-277
- Kishimoto H and Sprent J. (2001) A defect in central tolerance in NOD mice. *Nature Immunology*, 2:1025-1031
- Kleindienst P, Brocker T. (2005) Concerted antigen presentation by dendritic cells and B cells is necessary for optimal CD4 T-cell immunity in vivo. *Immunol*, 115:556-564
- Kosco-Vilbois MH. (2003) Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nat Rev Immunol*, 3:764-769
- Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ (2000) CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol*, 165:6606-6611
- Kovanen PE, Leonard WJ. (2004) Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15 and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev*, 202:67-83
- Krendel DA, Costigan DA, Hopkins LC. (1995) Successful treatment of neuropathies in patients with diabetes mellitus. *Arch Neurol*, 52:1053-1061

## VIII. Bibliografia

- Kukreja A and Maclaren NK. (1999) Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 4371-4378
- Kurosaki T. (1998) Molecular dissection of B cell antigen receptor signaling. *Bioorg Med Chem Lett*, 1:515-537
- Kwok WW, Domeier ME, Johnson ML, Nepom GT, Koelle DM. (1996) HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. *J Exp Med*, 183:1253-1258
- Lampeter EF, Klinghammer A, Scherbaum WA, Heinze E, Haastert B, Giani G, Kolb H. (1998) The deutsche nicotinamide intervention study. An Attempt to prevent type 1 diabetes. *Diabetes*, 47:980-984
- Lan MS, Wasserfall C, Maclaren NK, Notkins AL. (1996) IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:6367-6370
- Landin-Olsson M. (1990) Precision of the islet-cell antibody assay depends on the pancreas. *J Clin Lab Anal*, 4:289-294
- Landon F, Lemonnier M, Benarous R, Huc C, Fiszman M, Gros F, Portier MM. (1989) Multiple mRNAs encode peripherin, a neuronal intermediate filament protein. *EMBO J*, 8:1719-1726
- Landon F, Wolff A, Néchaud B. (2000) Mouse peripherin isoforms. *Biol Cell*, 92:397-407
- Lanzavecchia A. (1985) Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*, 314:537-539
- Lariviere RC, Julien JP. (2004) Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol*, 58:131-148
- Le Douarin NM. (1988) On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell*, 53:169-171
- Leiter EH, Von Herrath M. (2004) Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 2. In opposition to this proposal. *Diabetologia*, 47:1657-1660
- Leiter EH. (1997) The NOD mouse: a model for insulin-dependent diabetes mellitus. *Current Protocols in Immunology*, 24(Suppl):15.9.1-15.9.23
- Lemke H, Coutinho A, Lange H. (2004) Lamarckian inheritance by somatically acquired maternal IgG phenotypes. *TRENDS Immunol*, 25(4):180-186
- Lenschow DJ, Herold KC, Rhee L, Patel B, Koons A, Qin HY, Fuchs E, Singh B, Thompson CB, Bluestone JA. (1996) CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity*, 5:285-293
- Li YS, Wasserman R, Hayakawa K, Hardy RR. (1996) Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity*, 5:527-535

- Liao L, Sindhvani R, Rojkind M, Factor S, Leinwand L, Diamond B. (1995) Antibody-mediated autoimmune myocarditis depends on genetically determined target organ sensitivity. *J Exp Med*, 181:1123-1131
- Lieberman SM, DiLorenzo TP. (2003a) A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens*, 62:359-377
- Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP. (2003b) Identification of the  $\beta$  cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(14):8384-8388
- Lieberman SM, Takaki T, Han B, Santamaria P, Serreze DV, DiLorenzo TP. (2004) Individual nonobese diabetic mice exhibit unique patterns of CD8+ T cell reactivity to three islet antigens, including the newly identified widely expressed dystrophin kinase. *J Immunol*, 173:6727-6734
- Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. (2003) Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol*, 4:350-354
- Loder F, Mutschler B, Ray RJ, Paige CJ, Sideras P, Torres R, Lamers MC, Carsetti R. (1999) B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med*, 190:75-89
- Lohr J, Knoechel B, Nagabhushanam V, Abbas AK. (2005) T-cell tolerance and autoimmunity to systemic and tissue-restricted self-antigens. *Immunol Rev*, 204:116-127
- Lonrot M, Salminen K, Knip M, Savola K, Kulmala P, Leinikki P, Hyypia T, Akerblom HK, Hyoty H. Childhood diabetes in Finland (DiMe) study group. (2000) 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
- Lucassen AM, Julier C, Beressi JP, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, Bell JI. (1993) Susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *Nat Genet*, 4:305-310
- Ludwig B, Odermatt B, Landmann S, Hengartner H, Zinkernagel RM. (1998) Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J Exp Med*, 188:1493-1501
- Luzina IG, Atamas SP, Storrer CE, daSilva LC, Kelsoe G, Papadimitriou JC, Handwerker BS. (2001) Spontaneous formation of germinal centers in autoimmune mice. *Journal of Leukocyte Biology*. 70: 578-584
- Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. (2003) BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol*, 22:485-501

## VIII. Bibliografía

- Maclaren N, Atkinson M. (1992) Is insulin-dependent diabetes mellitus environmentally induced? *N Engl J Med*, 327:348-349
- Maclaren NK, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, Clare-Salzler M, She JX, Malone J, Crockett S, Schwartz S, Quattrin T, DeSilva M, Vander Vegt P, Notkins AL, Krischer J. (1999) Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-sbeta predict immune-mediated (type 1) diabetes in relatives. *J Autoimmun*, 12:279-287
- MacLennan EC. (1994) Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, 12:117-139
- Maier LM, Wicker LS. (2005) Genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Curr Opin Immunol*, 17:601-608
- Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. (1980) Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Exp Anim*, 29:1-8
- Malkiel S, Liao L, Cunningham MW, Diamond B. (2000) T-cell dependent antibody response to the dominant epitope of streptococcal polisaccharide, N-acetyl-glucosamine, is cross-reactive with cardiac myosin. *Infect Immun*, 68:5803-5808
- Marrack P, Kappler J. (2004) Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol*, 20:551-579
- Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Ríos M, Martínea Larrad MT, Teng WP, Park Y, Zhang ZX, Goldstein DR, Tao YW, Beaurain G, Bach JF, Huang HS, Luo DF, Zeidler A, Rotter JI, Yang MC, Modilevsky T, Maclaren NK, She JX. (1997) Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet*, 6(8):1275-1282
- Martin F and Chan AC. (2004) Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity: insights from the clinic. *Immunity*, 20:517-527
- Martin F, Kearney JF. (2000) B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 cells as part of a 'natural immune memory'. *Immunol. Rev.* 175:70-79
- Martin F, Kearney JF. (2001) B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr Opin Immunol*, 13:195-201
- Martin F, Kearney JF. (2002) Marginal-zone B cells. *Nature Rev Immunol*, 2:323-335
- Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, Roep BO. (2001) Development of Type 1 diabetes despite severe hereditary B-cell deficiency. *N Engl J Med*, 345:1036-1040
- Marx A, Müller-Hermelink HK, Ströbel P. (2003) The role of thymomas in the development of Myasthenia Gravis. *Ann N Y Acad Sci*, 998:223-236

- Mathiew C, Badenhop K. (2005) Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art. *Trends Endocrino Metab*, 16(6):261-266
- Mathis D, Vence L, Benoist C. (2001)  $\beta$ -Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414: 792-798
- Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. (2003) Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J Exp Med*, 197(4):489-501
- McHeyzer-Williams LJ, Driver DJ, McHeyzer-Williams MG. (2001) Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol*, 8:52-59
- McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. (2005) Antigen-specific memory B cell development. *Ann Rev Immunol.*, 23:487-513
- Meagher C, Sharif S, Hussain S, Cameron MJ, Arreaza GA, Delovitch TL. (2003) Cytokines and chemokines in the pathogenesis of murine type 1 diabetes. *Adv Exp Med Biol*, 520: 133-158
- Mebius RE, Kraal G. (2005) Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*, 5(8):606-616
- Mei Q, Mundinger O, Lernmark A, and Taborsky GJ Jr. (2002) Early, selective, and marked loss of sympathetic nerves from the islets of BioBreeder diabetic rats. *Diabetes*, 51:2997-3002
- Miller BJ, Appel MC, O'Neil JJ, Wicker LS. (1988) Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 140:52-58
- Miller S, Karpus WJ. (1994) The immune pathogenesis and regulation of T-cell mediated demyelinating diseases. *Immunol Today*, 15:358-362
- Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. (2002) The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol*, 169:4213-4221
- Miosge LA, Goodnow CC. (2005) Genes, pathways and checkpoints in lymphocyte development and homeostasis. *Immunol Cell Biol*, 83:318-335
- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK.. (2002) Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing Regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*, 16:219-230
- Modigliani Y, Coutinho A, Pereira P, Le Douarin N, Thomas-Vaslin V, Burlen-Defranoux O, Salaun J, Bandeira A. (1996) Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymus epithelium. *Eur J Immunol*, 26:1807-1815

## VIII. Bibliografia

- Mohan C, Datta SK. (1995) Lupus: key pathogenic mechanisms and contributing factors. *Clin Immunol Immunopathol*, 77:209-220
- Mond JJ, Lees A, Snapper CM. (1995) T cell- independent antigens type 2. *Ann Rev Immunol*, 13:665-692
- Moore DJ, Noorchashm H, Lin TH, Greeley SA, Naji A. (2005) NOD B-cells are insufficient to incite T-cell-mediated anti-islet autoimmunity. *Diabetes* 54:2019-2025
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. (2001) Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19:683-765
- Myersen U, Keymeulen B, Pipeleers DG, Sandler F. (1996) Beta cells are important for islet innervation: evidence from purified rat islet-cells grafts. *Diabetologia*, 39:54-59
- Nemazee D, Hogquist KA. (2003) Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol*, 15:182-189
- Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, Lyngsoe J, Poulsen JE, Ryder LP, Nielsen LS, Thomsen M, Svejgaard A. (1974) HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet*, ii:864-866
- Neumann H, Schmidt H, Cavalie A, Jenne D, Wekerle H. (1997) Major histocompatibility complex (MHC) class 1 gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN-gamma) and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . *J Exp Med*, 185:305-316
- Newsom Davis J, Vincent A. (1991) Antibody-mediated neurological disease. *Curr Opin Neurobiol*, 1:430-435
- Nishio J, Gaglia JL, Turvey SE, Campbell C, Benoist C, Mathis D. (2006) Islet recovery and reversal of murine type 1 diabetes in the absence of any infused spleen cell contribution. *Science*, 311: 1775-1778
- Noorchashm H, Bui A, Li HL, Eaton A, Mandik-Nayak L, Sokol C, Potts KM, Pure E, Erikson J. (1999b) Characterization of anergic anti-DNA B cells: B cell anergy is a T cell-independent and potentially reversible process. *International Immunology*, 11:765-776
- Noorchashm H, Lieu YK, Noorchashm N, Rostami SY, Greeley SA, Schlachterman A, Song HK, Noto LE, Jevnikar AM, Barker CF, Naji A. (1999a) I-A<sup>g7</sup>-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet  $\beta$  cells of nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 163:743-750
- Noorchashm H, Moore DJ, Noto LE, Noorchashm N, Reed AJ, Reed AL, Song HK, Mozaffari R, Jevnikar AM, Barker CF, Naji A. (2000) Impaired CD4 T cell activation due to reliance upon B cell-mediated costimulation in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Immunol*, 163:4683-4696

- Noorchashm H, Noorchashm N, Kern J, Rostami SY, Barker CF, Naji A. (1997) B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, 46:941-946
- Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, Yu L, Hoffman M, Chase HP, Erlich HA, Hammam RF, Eisenbarth GS, Rewers M. (1996) Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. *Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY) JAMA*, 276:609-614
- O'Brien BA, Geng X, Orteu CH, Huang Y, Ghoreishi M, Zhang Y, Bush JA, Li G, Finegood DT, Dutz JP. (2006) A deficiency in the in vivo clearance of apoptotic cells is a feature of the NOD mouse. *J Autoimmun*, 26(2):104-115
- O'Brien BA, Huang Y, Geng X, Dutz JP, Finegood DT. (2002) Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD is reduced. *Diabetes*, 51:2481-2488
- Oldstone MB. (1988) Prevention of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection. *Science*, 239:500-502
- Oldstone MBA. (1987) Molecular mimicry and autoimmune disease, 50:819-820
- Osmond DG, Rolink A, Melchers F. (1998) Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today*, 19:65-68
- Palmer E. (2003) Negative selection – clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*, 3:383-391
- Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. (1983) Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, 222:1337-1339
- Palmer JP. (2001) Immunomodulatory therapy of human type 1 diabetes: lessons from the mouse. *Journal of Clinical Investigation*, 108:31-33
- Parish NM, Cooke A. (1995) Animal models of autoimmune endocrine disease and their uses in developing new methods of intervention. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 9(1):175-198
- Parker DC. (1993) T cell-dependent B cell activation. *Ann Rev Immunol*, 11:331-360
- Pietropaolo M, Eisenbarth GS. (2001) Autoantibodies in human diabetes. In: *Molecular Pathology of Type 1 Diabetes Mellitus*. Von Herrath MG (ed.) *Curr Dir Autoimmun*. Basel, Karger, 4:252-282
- Pillai S, Cariappa A, Moran ST. (2005) Marginal Zone B cells. *Annu Rev Immunol*, 23:161-196
- Pinching AJ, Rees AJ, Russell BA, Lockwood CM, Mitchison RS, Peters DK. (1980) Relapses in Wegener's granulomatosis: the role of infection. *BMJ*, 281:836-838

## VIII. Bibliografia

- Pleau JM, Marche PN, Serrano MP, Boitard C, Bach JF. (1993) Evidence for antigen driven selection in two monoclonal auto-antibodies derived from nonobese diabetic mice. *Mol Immunol*, 30(14):1257-1264
- Porakishvili N, Mageed R, Jamin C, Pers JO, Kulikova N, Renaudineau Y, Lydyard PM, Youinou P. (2001) Recent progress in the understanding of B-cell functions in autoimmunity. *Scand J Immunol*, 54:30-38
- Portier MM, de Nechaud B, Gros F. (1983-84) Peripherin, a new member of the intermediate filament protein family. *Dev Neurosci*, 6(6):335-344
- Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, Beales PE. (1993) NOD mouse colonies around the world – recent facts and figures. *Immunology Today*, 14:193-196
- Prochazka M, Serreze DV, Frankel WN, Leiter EH.. (1992) NOR/Lt mice: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice. *Diabetes*, 41:98-106
- Pugliese A, Zeller M, Fernandez A JR, Zalcberg LJ, Barlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD. (1997) The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet*, 15:293-297
- Pulendran B, Kannourakis G, Nouri S, Smith KG, Nossal GJ. (1995) Soluble antigen can cause enhanced apoptosis of germinal-centre B cells. *Nature*, 375:331-334
- Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. (2004) CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Ann Rev Immunol*, 22:307-328
- Rabinovitch A, (2003) Immunoregulation by cytokines in autoimmune diabetes. *Adv Exp Med Biol*, 520:159-193
- Rajewsky K. (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381:751-758
- Ramanathan S and Poussier P. (2001) BB rat *lyp* mutation and Type 1 diabetes. *Immunol Rev*, 184:161-171
- Rathmell JC, Cooke MP, Ho WY, Grein J, Townsend SE, Davis MM, Goodnow CC. (1995) CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature*, 376:181-184
- Rathmell JC, Fournier S, Weintraub BC, Allison JP, Goodnow CC. (1998) Repression of B7.2 on self-reactive B cells is essential to prevent proliferation and allow Fas-mediated deletion by CD4+ T cells. *J Exp Med*, 188:651-659
- Ravetch JV, Lanier LL. (2000) Immune inhibitory receptors. *Science*, 290:84-89



- Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. (2001) Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*, 358(9.295):1749-1753
- Rees DA, Alcolado JC. (2005) Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*, 22:359-370
- Reth M. (1989) Antigen receptor tail clue. *Nature*, 338:383-384
- Rewers M, Norris JM, Eisenbarth GS, Erlich HA, Beaty B, Klingensmith G, Yu L, Bugawan TL, Hammam M, Groshek M, McDuffie RS Jr. (1996) Beta-cell autoantibodies in infants and toddlers without IDDM relatives: Diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *J Autoimmun*, 9:405-410
- Rickert RC, Rajewsky K, Roes J. (1995) Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature*, 376:352-355
- Ridgway WM, Fasso M, Fathman CG. (1999) A new look at MHC and autoimmune disease. *Science*, 284:749-751
- Robertson J, Doroudchi MM, Nguyen MD, Durham HD, Strong MJ, Shaw G, Julien JP, Mushynski WE. (2003) A neurotoxic peripherin splice variant in a mouse model of ALS. *J Cell Biol*, 17;160:939-49.
- Rocken M, Urban JF, Shevach EM. (1992) Infection breaks T-cell tolerance. *Nature*, 359:79-82
- Roep BO, Atkinson M, von Herrath M.. (2004) Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animals models of type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*, 4:989-997
- Roep BO, Atkinson M. (2004) Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 1. In support of this proposal. *Diabetologia*, 47:1650-1656
- Rojas M, Hulbert C, Thomas JW. (2001) Anergy and not clonal ignorance determines the fate of B cells that recognize a physiological autoantigen. *J Immunol*, 166:3194-3200
- Rolink A, Melchers F. (1993) B lymphopoiesis in the mouse. *Adv Immunol*, 53:123-156
- Romagnani S. (1997) The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today*, 18:263-267
- Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. (2001) Type 1 regulatory cells. *Immunol Rev*, 182:68-79
- Rosenbaum T, Vidaltamayo R, Sanchez-Soto MC, Zentella A, Hiriart M. (1998) Pancreatic B cells synthesize and secrete nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:5166-5171
- Rosmalen JG, Leenen PJ, Katz JD, Voerman JS, Drexhage HA. (1997) Dendritic cells in the autoimmune insulinitis in NOD mouse models of diabetes. *Adv Exp Med Biol*, 417:291-294

## VIII. Bibliografia

- Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R. (1993) Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen stimulated suicide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:4409-4413
- Sakaguchi S. (2000) Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 101:455-458
- Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. (2000) B7/CD28 Costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ Immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 12:431-440
- Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, Hsin H, Montag A, Soliven B, Arcella J, Girvin AM, Padilla J, Miller SD, Bluestone JA. (2001) Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med*, 194(5):677-684
- 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. (2002) Neurology and neuropathology of the pancreatic innervation. *J Pancreas*, 3:23-33
- Sanchez D, Baeza N, Blouin R, Devaux C, Grondin G, Mabrouk D, Guy-Crotte O, Figarella C. (2000) Overexpression of the reg gene in non-obese diabetic mouse pancreas during active diabetogenesis is restricted to exocrine tissue. *J Histochem Cytochem*, 48(10):1401-1410
- Santamaria P, Utsugi T, Park BJ, Averill N, Kawazu S, Yoon JW. (1995) Beta-cell-cytotoxic CD8+ cells from nonobese diabetic mice use highly homologous T cell receptor alpha-chain CDR3 sequences. *J Immunol*, 154:2494-2503
- Santamaria P. (2001) Effector lymphocytes in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 13:663-669
- Saravia F, Homo-Delarche F. (2003) Is innervation an early target in autoimmune diabetes? *TRENDS Immunol*, 24(11):574-579
- Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. (2000) Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol*, 165:6635-6643
- Sato S, Ono N, Steeber DA, Pisetsky DS, Tedder TF. (1996) CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol*, 157:4371-4378
- Schultze JL, Grabbe S, von Bergwelt-Baildon MS. (2004) DCs and CD40-activated B cells: current and future avenues to cellular cancer immunotherapy. *TRENDS Immunol*, 25(12):659-664
- Schwimmbeck P, Yu DT, Oldstone MBA. (1987) Autoantibodies to HLA-B27 in sera of patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. *J Exp Med*, 166:173-181

- Seewaldt S, Thomas HE, Ejrnaes M, Christen U, Wolfe T, Rodrigo E, Coon B, Michelsen B, Kay TW, von Herrath MG. (2000) Virus-induced autoimmune diabetes: most beta-cells die through inflammatory cytokines and not perforin from autoreactive (anti-viral) cytotoxic T-lymphocytes. *Diabetes*, 49:1801-1809
- Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Hanson MS, Reifsnyder PC, Richard SD, Fleming SA, Leiter EH, Shultz LD. (1996) B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Igmu null mice. *J Exp Med*, 184:2049-2053
- Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. (1998) B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 161:3912-3918
- Serreze DV, Leiter EH, Christianson GJ, Greiner D, Roopenian DC. (1994) Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2null mice are diabetes and insulinitis resistant. *Diabetes*, 43:505-509
- Serreze DV, Prochazka M, Reifsnyder PC, Bridgett MM, Leiter EH. (1994) Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *J Exp Med*, 180:1553-1558
- Serreze DV, Silveira PA. (2003) The role of B lymphocytes as key antigen-presenting cells in the development of T cell-mediated autoimmune Type 1 diabetes. Nemazee D (ed): *B cell biology in autoimmunity*. *Curr Dir Autoimmun*, 6:212-227
- Sharpe EH, Freeman GJ. (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2:116-126
- She JX. (1996) HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today*, 17:323-329
- Shervani NJ, Takasawa S, Uchigata Y, Akiyama T, Nakagawa K, Noguchi N, Takada H, Takahashi I, Yamauchi A, Ikeda T, Iwamoto Y, Nata K, Okamoto H. (2004) Autoantibodies to REG, a beta-cell regeneration factor, in diabetic patients. *Eur J Clin Invest*, 34(11):752-758
- Shevach EM. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity. *Ann Rev Immunol*, 18:423-449
- Shinall SM, Gonzalez-Fernandez M, Noelle RJ, Waldschmidt TJ. (2000) Identification of murine germinal center B subsets defined by the expression of surface isotypes and differentiation antigens. *J Immunol*, 164:5729-5738
- Shokat KM, Goodnow CC. (1995) Antigen-induced B-cell death and elimination during germinal-centre immune responses. *Nature*, 375:334-338
- Silveira PA, Dombrowsky J, Johnson E, Chapman HD, Nemazee D, Serreze DV. (2004) B cell selection defects underlie the development of diabetogenic APCs in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 172:5086-5094

## VIII. Bibliografia

- Silveira PA, Grey ST. (2006) B cells in the spotlight: innocent bystanders or major players in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*, 17:128-135
- Silveira PA, Johnson E, Chapman HD, Bui T, Tisch RM, Serreze DV. (2002) The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors. *Eur J Immunol*, 32:3657-3666
- Slack JM. (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121:1569-1580
- Smink LJ, Helton EM, Healy BC, Cavnor CC, Lam AC, Flamez D, Burren OS, Wang Y, Dolman GE, Burdick DB, Everett VH, Glusman G, Laneri D, Rowen L, Schuilenburg H, Walker NM, Mychaleckyj J, Wicker LS, Eizirik DL, Todd JA, Goodman N. (2005). T1DBase, a community web-based resource for type 1 diabetes research. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jan 1;33 Database Issue:D544-9. PMID: 15608258
- Smith K, Seddon B, Purbhoo MA, Zamoyska R, Fisher AG, Merckenschlager M. (2001) Sensory adaptation in naïve peripheral CD4 T cells. *J Exp Med*, 194:1253-1261
- Soltesz G (2003) Diabetes in the young: a paediatric and epidemiological perspective. *Diabetologia*, 46:447-454
- Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C, Vives-Pi M, Fernández-Figueras MT, Ariza A, Gomis R, Bragado R, Martí M, Jaraquemada D, Pujol-Borrell R. (1994) Pancreas 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
- Sterneck E, Kaplan DR, Johnson PF. (1996) Interleukin-6 induces expression of peripherin and cooperates with Trk receptor signaling to promote neuronal differentiation in PC12 cells. *J Neurochem*, 67(4):1365-1374
- Strasser A, Bouillet P. (2003) The control of apoptosis in lymphocyte selection. *Immunol Rev*, 193:82-92
- Streilein JW, Ksander BR, Taylor AW. (1997) Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *J Immunol*, 158:3557-3560
- Su I, Tarakhovsky A. (2000) B-1 cells: orthodox or conformist? *Curr Opin Immunol*, 12:191-194
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. (1998) Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol*, 10:1969-1980
- Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. (2001) T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol*, 167:4710-4718

- Talal N, Dauphinee M, Ahmed SA. (1992) CD5 B cells in autoimmunity. *Ann NY Acad Sci* 651:551-556
- Taurog JD, Maika SD, Satumtira N, Dorris ML, McLean IL, Yanagisawa H, Sayad A, Stagg AJ, Fox GM, Le O'Brien A, Rehman M, Zhou M, Weiner AL, Splawski JB, Richardson JA, Hammer RE. (1999) Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol Rev*, 169:209-223
- Teitelman G, Guz Y, Ivkovic S, Ehrlich M. (1998) Islet injury induces neurotrophin expression in pancreatic cells and reactive gliosis of peri-islet Schwann cells. *J Neurobiol*, 32: 304-318
- Tew JG, Kosko MH, Burton GF, Szakal AK. (1990) Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol Rev*, 117:185-211
- The diabetes prevention trial-type 1 study group. (2002) Effects of insulin in relatives of patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med*, 346(22):1685-1691
- The diabetes prevention trial-type 1 study group. (2005) Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes. The prevention trial-type 1. *Diabetes Care*, 28:1068-1076
- Thornton AM, Shevach EM. (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 188:287-296
- Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. (2001) Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 167:1081-1089
- Tian J, Zekzer D, Lu Y, Dang H, Kaufman DL. (2006) B cells are crucial for determinant spreading of T cell autoimmunity among  $\beta$  cell antigens in diabetes-prone nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 176:2654-2661
- Tisch R, McDevitt H. (1996) Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*, 85:291-297
- Tisch R, Wang B, Serreze DV. (1999) Induction of glutamic acid decarboxylase 65-specific Th2 cells and suppression of autoimmune diabetes at late stages of disease is epitope dependent. *J Immunol*, 163(3):1178-1187
- Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO. (1993) Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature*, 366:72-75
- Todd JA, Wicker LS. (2001) Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. *Immunity*, 15:387-395

## VIII. Bibliografia

- Toellner JM, Gulbranson-Judge A, Taylor DR, Sze DM, MacLennan IC. (1996) Immunoglobulin switch transcript production in vivo related to the site and time of antigen-specific B cell activation. *J Exp Med*, 183:2303-2312
- Tomer Y, Shoenfeld Y. (1989) The significance of T suppressor cells in the development of autoimmunity. *J Autoimmun*, 2:739-758
- Troy CM, Muma NA, Greene LA, Price DL, Shelanski ML. (1990) Regulation of peripherin and neurofilament expression in regenerating rat motor neurons. *Brain Res*, 529(1-2):232-238
- Tuscano JM, Harris GS, Tedder TF. (2003) B lymphocytes contribute to autoimmune disease pathogenesis: current trends and clinical implications. *Autoimmun Rev*, 2:101-108
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyanthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC. (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423:506-511
- Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, Wickramasinghe S, Colle E, Polychronakos C. (1997) Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet*, 15:289-292
- Van Kooten C, Banchereau J. (1997) Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol*, 9:330-337
- Verdaguer J, Amrani A, Anderson B, Schmidt D, Santamaria P. (1999) Two mechanisms for the non-MHC-linked resistance to spontaneous autoimmunity. *J Immunol*, 162:4614-4626
- Verdaguer J, Yoon JW, Anderson B, Averill N, Utsugi T, Park BJ, Santamaria P. (1996) Acceleration of spontaneous diabetes in TCR-beta-transgenic nonobese diabetic mice by beta-cell cytotoxic CD8+ T cells expressing identical endogenous TCR-alpha chains. *J Immunol*, 157, 4726-4735
- Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase PH, Eisenbarth GS. (1996) Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*, 45:926-933
- Vinik AI, Mehrabyan A. (2004) Diabetic neuropathies. *Med Clin N Am*, 88:947-999

- Vives-Pi M, Armengol MP, Alcalde L, Costa M, Somoza N, Vargas F, Jaraquemada D, Pujol-Borrell R. (1996) Expression of Transport 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*, 45:779-788
- Vives-Pi M, Somoza N, Vargas F, Pujol-Borrell R. (1995) Overexpression of MHC proteins in pancreatic islets: a link between cytokines, viruses, breach of tolerance and insulin dependent diabetes mellitus. In: *Modulation of MHC antigen expression and disease*, Ed: GE Blair, CR Pringle and DJ Maudsley. Cambridge University Press. pp.361-389
- Von Herrath MG, Oldstone M, Homann D, Christen U. (2001) Is activation of autoreactive lymphocytes always detrimental? *Viral infections and regulatory circuits in autoimmunity*. In: *Molecular pathology of type 1 Diabetes mellitus*. Curr Dir Autoimmun. Basel, Karger, 4:91-122
- Vyse TJ, Todd JA. (1996) Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell*, 85:311-318
- Wagle NM, Kim JH, Pierce SK. (2000) CD19 regulates B cell antigen receptor-mediated MHC class II antigen processing. *Vaccine*, 18:376-386
- Walport MJ. (2001) Complement. *N Engl J Med*, 344:1140-1144
- Wang B, Gonzalez A, Benoist C, Mathis D. (1996) The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol*, 26:1762-1769
- Wang CY, Davoody-Semiromi A, Huang W, Connor E, Shi JD, She JX. (1998) Characterization of mutations in patients with autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS1). *Hum Genet*, 103:381-385
- Wertman E, Zilber N, Abramsky O. (1992) An association between multiple sclerosis and type 1 diabetes mellitus. *J Neurol*, 239(1):43-45
- Wicker LS, Appel MC, Dotta F, Pressey A, Miller BJ, DeLarato NH, Fischer PA, Boltz RC Jr, Peterson LB. (1991) Autoimmune syndromes in Major Histocompatibility Complex (MHC) congenic strains of nonobese diabetic (NOD) mice. The NOD MHC is dominant for insulinitis and cyclophosphamide-induced diabetes. *J Exp Med*, 176:67-77
- Wicker LS, Leiter EH, Todd JA, Renjilian RJ, Peterson E, Fischer PA, Podolin PL, Zijlstra M, Jaenisch R, Peterson LB. (1994) Beta2-microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes. *Diabetes*, 43:500-504
- Wilder RL. (1996) Hormones and autoimmunity: animal models of arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol*, 10:259-271
- Wilkin TJ. (2001) The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 44(7):914-922

## VIII. Bibliografia

- Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA. (1998) Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature*, 391:177-181
- Winer S, Astsaturon I, Cheung RK, Schrade K, Gunaratnam L, Kubiak V, Cortez MA, Moscarello M, O'Connor PW, McKerlie C, Becker DJ, Dosch HM. (2001b) Type 1 diabetes and Multiple Sclerosis patients target islet plus central nervous system autoantigens; nonimmunized nonobese diabetic mice can develop autoimmune encephalitis. *J Immunol*, 166:2831-2841
- Winer S, Astsaturon I, Cheung RK, Schrade K, Gunaratnam L, Wood DD, Moscarello MS, O'Connor P, McKerlie C, Becker DJ, Dosch HM. (2001a) T cells of multiple sclerosis patients target a common environmental peptide that causes encephalitis in mice. *J Immunol*, 166(7):4751-4756
- Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, Sampson A, Afifyan F, Elford A, Jackowski G, Becker DJ, Santamaria P, Ohashi P, Dosch HM.. (2003) Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not  $\beta$ -cell exclusive. *Nat Med*, 9:198-205
- Wolniak KL, Shinall SM, Waldschmidt TJ. (2004) The germinal center response. *Crit Rev Immunol*, 24:39-65
- Wong FS, Karttunen J, Dumont C, Wen L, Visintin I, Pilip IM, Shastri N, Pamer EG, Janeway CA Jr. (1999) Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med*, 5:1026-1031
- Wong FS, Visintin I, Wen L, Granata J, Flavell R, Janeway CA. (1998) The role of lymphocyte subsets in accelerated diabetes in nonobese diabetic-rat insulin promoter-B7-1 (NOD-RIP-B7-1) mice. *J Exp Med*, 187:1985-1993
- Wong FS, Wen L, Tang M, Ramanathan M, Visintin I, Daugherty J, Hannum LG, Janeway CA Jr, Shlomchik MJ. (2004) Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetes*, 53:2581-2587
- Wong FS, Wen L. (2005) B cells in autoimmune diabetes. *The review of diabetic studies*, 2(3):121-135
- Wortis HH, Berland R. (2001) Cutting Edge Commentary: Origins of B-1 Cells. *J Immunol*, 166:2163-2166
- Wucherpfennig KW, Eisenbarth GS. (2001a) Type 1 diabetes. *Nature Immunology*, 2:767-768
- Wucherpfennig KW, Strominger JL. (1995) Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: A mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases. *J Exp Med*, 181:1597-1601



- Wucherpfening KW. (2001b) Insights into autoimmunity gained from structural analysis of MHC-peptide complexes. *Curr Opin Immunol*, 13:650-656
- Xu XJ, Gearon C, Stevens E, Vergani D, Baum H, Peakman M. (1999) Spontaneous T-cell proliferation in the non-obese diabetic mouse to a peptide from the unique class II MHC molecule, I-Ag7, which is also protective against the development of autoimmune diabetes. *Diabetologia*, 42(5):560-565
- Yagi H, Matsumoto M, Kunimoto K, Kawaguchi J, Makino S, Harada M. (1992) Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. *Eur J Immunol*, 22:2387-2393
- Yang Y, Santamaria P. (2003) Dissecting autoimmune diabetes through genetic manipulation of non-obese diabetic mice. *Diabetologia*, 46:1447-1464
- Yang Y, Santamaria P. (2004) T-cell receptor-transgenic NOD mice: a reductionist approach to understand autoimmune diabetes. *J Autoimmun*, 22:121-129
- Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. (1979) Virus-induced diabetes mellitus: isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med*, 300:1173-1179
- Yoon JW, Jun HS, Santamaria P. (1998) Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity*, 27:109-122
- Youinou P, Jamin C, Lydyard PM. (1999) CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol Today*, 20: 312-316
- Yu L, Robles DT, Abiru N, Kaur P, Rewers M, Kelemen K, Eisenbarth GS. (2000) Early expression of antiinsulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:1701-1706
- Yuki N. (1999) Pathogenesis of Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *Jpn J Infect Dis*, 52:99-105
- Yung RL, Johnson KJ, Richardson BC. (1995) New concepts in the pathogenesis of drug-induced lupus. *Lab Invest*, 73:746-759
- Zanone MM, Favaro E, Catalfamo E, Quadri R, Sacchetti C, Cerutti F, Perin PC, Camussi G. (2003) Autonomic function and autoantibodies to autonomic nervous tissues at follow-up in a cohort of young patients with type 1 diabetes. Effects of serum from diabetic patients on human adrenergic cells. *J Neuroimmunol*, 139:66-75
- Zanone MM, Peakman M, Purewal T, Watkins PJ, Vergani D. (1993) Autoantibodies to nervous tissue structures are associated with autonomic neuropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 36:564-569

## VIII. Bibliografia

- Zhang J, Roschke V, Baker KP, Wang Z, Alarcon GS, Fessler BJ, Bastian H, Kimberly RP, Zhou T. (2001) Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 166:6-10
- Zhao ZS, Granucci F, Yeh L, Schaffer PA, Cantor H. (1998) Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science*, 279:1344-1347
- Zhu J, Bai XF, Mix E, Link H. (1997) Cytokine dichotomy in peripheral nervous system influences the outcome of experimental allergic neuritis: dynamics of mRNA expression for IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , and cytolysin. *Clin Immunol Immunopathol*, 84:85-94
- Zuklys S, Balciunaite G, Agarwal A, Fasler-Kan E, Palmer E, Hollander GA. (2000) Normal thymic architecture and negative selection are associated with aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol*, 165:1976-1978

**Portada:** Corte histológico del páncreas de un ratón NOD, teñido con azul de metileno. Detalle de un islote con insulitis leve.