

**Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i
Immunologia**

**PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA I
ALTERACIONS IMMUNOLÒGIQUES
IDENTIFICADES A L'ÒRGAN DIANA
DE LA DIABETIS TIPUS 1**

Raquel Planas Bas

**Memòria de la Tesi Doctoral presentada per optar
al grau de Doctor en Immunologia per la
Universitat Autònoma de Barcelona**

Febrer de 2010

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i
Immunologia

Institut d'Investigació en Ciències de la Salut
Germans Trias i Pujol

Universitat Autònoma de Barcelona

Laboratori d'Immunobiologia per la Recerca i
Aplicacions Diagnòstiques (LIRAD)

Banc de Sang i Teixits (BST)

Ctra del Canyet s/n
08916 Badalona
Tel. 93.497.86.66
Fax 93.497.86.68
e-mail mvives.liradbst.germanstrias@gencat.cat



La Dra. Marta Vives Pi, Professora Associada d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona i Investigadora Biomèdica del LIRAD (Banc de Sang i Teixits) i la Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol,

Cerifica:

Que la tesi que porta per títol *PERFILS D'EXPRESSION GÈNICA I ALTERACIONS IMMUNOLÒGIQUES IDENTIFICADES A L'ÒRGAN DIANA DE LA DIABETIS TIPUS 1* ha estat realitzada per Raquel Planas Bas sota la seva direcció i considera que és apta per ser presentada i optar al grau de Doctor en Immunologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I per tal que en quedi constància, signa la present certificació a Badalona el 17 de desembre de 2009.

Dra. Marta Vives Pi

Aquesta tesi ha estat finançada mitjançant ajudes concedides pel *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS 02/0107 i PI060465) i la *Juvenile Diabetes Research Foundation* (JDRF 5-2007-269). La doctoranda ha percebut ajudes del *Fondo de investigación Sanitaria* a través del projecte FIS 02/0107 i de l'ajuda FI05/00418, corresponent al programa *Ayudas predoctorales de Formación en Investigación del Instituto de Salud Carlos III*. La impressió de la tesi ha estat subvencionada mitjançant les ajudes del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Imatge de la portada: illot de Langerhans d'un pacient amb diabetis tipus 1. Tinció d'una secció de teixit pancreàtic mitjançant doble immunofluorescència mostrant les cèl·lules productores d'insulina en vermell i els limfòcits T infiltrants en verd.

“Mentre buscava el tresor, tots els dies van ser lluminosos, perquè sabia que cada hora formava part del somni de trobar. Pel camí, mentre buscava el tresor, vaig descobrir coses que mai no m’hauria imaginat que arribaria a saber, si no hagués tingut el valor d’emprendre coses impossibles per als pastors.”

L’alquimista, Paulo Coelho

Als meus pares

ABREVIATURES

ABREVIATURES

APC	cèl.lula presentadora d'antigen
AITD	malaltia autoimmunitària de la glàndula tiroide
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCR	receptor de les cèl.lules B
CBP	cirrosi biliar primària
CCL	quimiocina tipus CC
CD	grup de diferenciació
CMV	citomegalovirus
CXCL	quimiocina tipus CXC
cDNA	àcid desoxiribonucleic (DNA) còpia
CRP	proteïna C reactiva
CY	ciclofosfamida
Cy3	cianina 3
Cy5	cianina 5
DAMP	patró molecular associat a perill
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DC	cèl.lula dendrítica
DEPC	dietilpirocarbonat
DNA	àcid desoxiribonucleic
DNAsa	desoxiribonucleasa
DP-BB	rata BioBreeding susceptible a la diabetis
DT1	diabetis tipus 1
EEM	error estàndard de la mitjana
EBV	virus Epstein Barr
FBS	sèrum fetal boví
FDR	<i>false discovery rate</i>
FISH	hibridació <i>in situ</i> fluorescent
FITC	isotiocianat de fluoresceïna
FMc	microquimerisme fetal
GAD	descarboxilasa de l'àcid glutàmic
GADA	anticossos descarboxilasa de l'àcid glutàmic
GFAP	proteïna glial àcida fibril.lar
HBSS	solució tamponada de Hank
HLA	antígens leucocitaris humans
H&E	hematoxilina i eosina
HPRT1	hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa 1

HSP	proteïna de xoc tèrmic
IAA	anticossos anti-insulina
IA-2	antigen 2 associat a insulinoma
IA-2A	autoanticossos anti-IA-2
ICA	anticòs anti-illot
ICAM	molècula d'adhesió intercel.lular 1
IFL	immunofluorescència
IFN	interferó
Ig	immunoglobulina
IGRP	glucosa-6-fosfatasa específica d'illot
IIM	miositis idiopàtica inflamatòria
IL	interleucina
INS	insulina
INSR	receptor de la insulina
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
LES	lupus eritematós sistèmic
LOG ₂ FC	logaritme del <i>fold change</i>
LYZ	lisozima
Mc	microquimerisme
MHC	complex major d'histocompatibilitat
MMc	microquimerisme matern
MMLV	transcriptasa reversa del virus de la leucèmia murina de Moloney
MODY	diabetis de l'adult d'inici juvenil
MS	esclerosi múltiple
mTEC	cèl.lula epitelial medul.lar del timus
NK	citocida natural
NIMA	antígen matern no heretat
NOD	no obès diabètic
NOR	no obès resistent
PAMP	patró molecular associat a patògens
PBMC	cèl.lula mononuclear de sang perifèrica
PBS	solució salina tamponada amb fosfat
pDC	cèl.lula dendrítica plasmacitoide
PsA	psoriasi artrítica
qPCR	reacció en cadena de la polimerasa quantitativa
RA	artritis reumatoide
REG	gen de regeneració
RIP	promotor del gen de la insulina de rata
RNA	àcid ribonucleic

RNAsa	ribonucleasa
SCID	immunodeficiència combinada severa
SPF	condicions lliures de patògens específics
SSC	solució salina tamponada amb citrat sòdic
SSc	esclerosi sistèmica
SSj	síndrome de Sjögren
STAT	transductor de senyals i activador de la transcripció
STZ	estreptozotocina
TAP	transportador associat amb processament d'antígens
TCR	receptor de les cèl.lules T
TGF β	factor de creixement i transformació beta
Th	limfòcit T col.laborador
TLR	receptor de tipus <i>toll</i>
TNF- α	factor de necrosi tumoral alfa
Tregs	limfòcits T reguladors
TRITC	isotiocianat de tetrametilrodamina
VCAM1	molècula d'adhesió vascular 1

ÍNDEX

ÍNDEX

ABREVIATURES	1
ÍNDEX	5
RESUM	9
INTRODUCCIÓ	11
1. DIABETIS MELLITUS TIPUS 1	11
1.1 Clínica	11
1.2. Epidemiologia	12
1.3. Prevenció i curació	13
2. ETIOLOGIA DE LA DT1	13
2.1 Factors genètics de susceptibilitat	14
2.2. Factors ambientals	16
2.2.1 Agents infecciosos i DT1	17
2.2.1.1. Virus	17
2.2.1.2. Bacteris	19
2.2.1.3. Helminths	19
2.2.1.4. Hipòtesi de la higiene	20
2.2.1.5. Microbiota intestinal	20
2.2.2. Dieta	20
2.2.3. Vitamina D	21
2.2.4. Toxines	21
2.2.5. Factors psicosocials	21
2.3. Factors estocàstics	22
3. ANATOMIA I FISIOLOGIA DEL PÀNCREES I DELS ILLOTS DE LANGERHANS	22
4. AUTOIMMUNITAT CONTRA LA CÈL.LULA β EN LA DT1 HUMANA	24
4.1. La resposta autoimmunitària	24
4.2. Autoantígens en DT1	25
4.3. Autoanticossos	26
4.4. Limfòcits T	27
4.5. Presentació antigènica	27
4.6. Inflamació i immunitat innata	28
4.7. Mecanismes de citotoxicitat de les cèl.lules β	29
4.8. Alteracions en la tolerància central	29
4.9. Alteracions en la tolerància perifèrica	30
4.10. Autoimmunitat a l'òrgan diana en la DT1 humana	30
5. MODELS EXPERIMENTALS DE DT1	32
5.1 Models induïts	32
5.1.1. Models induïts quirúrgicament	32
5.1.2. Models induïts farmacològicament	32
5.1.3. Models induïts a través de virus	33
5.2. Models espontanis	33
5.2.1. Ratolí NOD	33
5.2.2. Rata BioBreeding (DP-BB)	38
5.3. Models genèticament modificats	38

5.3.1. Efecte de l'interferó β en la DT1: models experimentals	38
5.3.1.1. Generalitats de l'IFN β	39
5.3.1.2. Models transgènics d'IFN β	40
6. TRANSCRIPTÒMICA: APLICABILITAT EN LA DT1	41
6.1. <i>Microarrays</i> d'expressió gènica: Metodologia i aplicacions	41
6.2. Aplicacions dels perfils d'expressió gènica en l'autoimmunitat	43
7. REGENERACIÓ DE CÈL·LULES β EN LA DT1: PAPER DE LA FAMÍLIA REG	45
7.1 Mecanismes de regeneració de cèl·lules β	45
7.2. Família REG –gens de regeneració- en la DT1	46
8. MICROQUIMERISME MATERN I DT1	49
8.1. Microquimerisme matern i fetal	49
8.2. Microquimerisme i malalties autoimmunitàries	50
HIPÒTESI I OBJECTIUS	53
1. HIPÒTESI	53
2. OBJECTIUS	54
MATERIAL I MÈTODES	55
1. SUBSTRATS	55
1.1. Humans	55
1.2. Murins	56
1.3. Línia cel·lular NIT-1	57
2. PROCESSAMENT DE PÀNCREES	57
2.1. Humans	57
2.2. Murins	58
3. HISTOLOGIA	59
3.1 Hematoxilina i eosina (H&E)	59
3.2. Índex de la insulitis en illots murins	59
3.3. Anàlisi morfològica de l'àrea insular	59
3.4. Doble immunofluorescència (IFL) indirecta	59
4. MICROARRAYS	62
4.1. <i>Microarrays</i> de cDNA	62
4.1.1. Obtenció de RNA	62
4.1.2. Anàlisi de la integritat del RNA	62
4.1.3. Retrotranscripció i marcatge directe de cDNA	63
4.1.4. Hibridació i anàlisi	63
4.2. <i>Microarrays</i> d'oligonucleòtids d'alta densitat	64
4.2.1. Processament de les mostres i hibridació	65
4.2.2. Anàlisi estadística i bioinformàtica	66
5. PCR QUANTITATIVA (qPCR)	66
5.1. Transcripció reversa	66
5.2. qPCR amb SYBR Green I	67
5.3. qPCR amb sondes Taqman	69
6. DETERMINACIÓ DE CITOCINES I QUIMIOCINES MITJANÇANT ARRAYS DE PROTEÏNA	69

7. HIBRIDACIÓ <i>IN SITU</i> FLUORESCENT (FISH) : DETECCIÓ DE MMc	70
7.1. FISH	70
7.2. FISH i IFL concomitants	72
7. ANÀLISI ESTADÍSTICA	73
RESULTATS	75
1. PERFILS D'EXPRESSIÓ DEL PÀNCREES I ELS ILLOTS EN PACIENTS AMB DT1	75
1.1. Fenotipat de la insulitis	75
1.2. Transcriptoma del pàncrees i dels illots	76
1.2.1 Gens amb expressió diferencial	76
1.2.2. Anotació funcional dels gens diferencialment expressats	78
1.2.3. Sobreexpressió de trànscripats del sistema immunitari	84
1.2.4. Variacions transcripcionals indicatives de dany tissular i reparació/regeneració	98
1.2.5. Alteració de gens de les cèl.lules endocrines insulars	98
1.2.6. Reducció de trànscripats propis del sistema nerviós	100
1.2.7. Afectació de gens del teixit exocrí	100
1.3. Validació de les dades de <i>microarrays</i> mitjançant qPCR	102
1.4. Distribució tissular de factors diferencialment expressats	104
2. MICROQUIMERISME MATERN EN PÀNCREES EN LA DT1	107
2.1. Increment de MMc en pàncrees de pacients amb DT1	107
2.2. Cèl.lules β d'origen matern	109
3. MEDIADORS DE LA RESPOSTA AUTOIMMUNITÀRIA A L'ÒRGAN DIANA EN LA DT1 EXPERIMENTAL	111
3.1. Citocines i quimiocines en la DT1 experimental mediada per IFN β	111
3.2. Efecte de l'IFN β en l'expressió de gens Reg en la DT1 experimental	113
3.2.1. Sobreexpressió de Reg2 als illots de ratolins NOD RIP-IFN β	113
3.2.2. Anàlisi histològica de l'expressió insular de Reg	115
3.2.3. Efecte de la insulitis en la sobreexpressió de Reg als illots del model RIP-IFN β	117
3.2.4. Efecte directe de l'IFN β la sobreexpressió de Reg	118
3.2.5. Correlació de la inducció de Reg amb l'augment d'expressió d'IL-6	119
3.2.6. Correlació de Reg2 amb una hiperplàsia insular en el model transgènic	120
DISCUSSIÓ	123
1. EL TRANSCRIPTOMA DEL TEIXIT DIANA REVELA L'ABAST I LA COMPLEXITAT DE LA RESPOSTA AUTOIMMUNITÀRIA EN LA DT1 HUMANA	123
2. EL MMc PODRIA INFLUÏR EN ELS PROCESSOS DE DESTRUCCIÓ I REGENERACIÓ DE LES CÈL.LULES β	136
3. LES CITOCINES, QUIMIOCINES I GENS REG CONTRIBUEIXEN A L'ACCELERACIÓ DE LA DT1 EXPERIMENTAL MEDIADA PER IFNβ	139
4. CONSIDERACIONS FINALS	143
CONCLUSIONS	145
PUBLICACIONS DERIVADES DE L'ETAPA PRE-DOCTORAL	147

BIBLIOGRAFIA	149
AGRAÏMENTS	173

RESUM

RESUM

La diabetis tipus 1 (DT1) és una malaltia autoimmunitària produïda per una destrucció de les cèl.lules β dels illots de Langerhans, productores d'insulina. La seva etiologia és desconeguda, però se sap que hi intervenen factors de susceptibilitat genètica, factors ambientals i estocàstics. Quan es trenca la tolerància enfront a antígens insulars, apareix un infiltrat leucocitari als illots pancreàtics, format principalment per limfòcits T autoreactius i macròfags, causant una destrucció autoimmunitària de les cèl.lules β . En els darrers anys s'han identificat aquests i d'altres fenòmens immunològics en illots de pacients amb DT1. Tot i així, la manca d'accés a aquest tipus de teixit fa que les alteracions que es coneixin fins al moment siguin molt limitades. Al llarg dels anys, el nostre grup ha obtingut una col.lecció de mostres de pàncrees de pacients en diferents fases de progressió de la malaltia -inici i cronificació-. Una part d'aquest estudi consisteix en la descripció dels perfils d'expressió gènica, establint una comparativa entre pàncrees total i el seu component endocrí (diana) purificat. Els perfils descrits mitjançant *microarrays* demostren l'augment d'expressió de gens pertanyents a vies funcionals del sistema immunitari, destacant la presentació antigènica, molècules d'adhesió, resposta humoral, factors inflamatoris i de la immunitat innata i gens amb funció immunoreguladora. Les nostres dades posen de manifest la persistència de la resposta inflamatòria i immunitària al llarg dels anys, essent més prominent en pàncrees que en illots purificats, així com l'afectació inflamatòria del teixit exocrí. A més de la reducció de trànscrips propis de cèl.lules β , destaca també la reducció de trànscrips del sistema nerviós als illots i a l'inici clínic també del teixit exocrí. Paral.lelament es detecta també una sobreexpressió de factors que reflexen un intent de regeneració insular.

Com a part de la caracterització del pàncrees en la DT1 es va abordar l'estudi del microquimerisme matern –fenòmen associat a l'autoimmunitat- en pàncrees de pacients. La presència de cèl.lules d'origen matern, capaces de travessar la barrera fetoplacentària durant l'embaràs i d'implantar-se en teixits de l'hoste, s'havia relacionat prèviament amb diverses malalties autoimmunitàries. Tot i que és una hipòtesi encara per demostrar, les cèl.lules maternes han estat considerades com a cèl.lules potencialment autoreactives, com a possibles dianes de l'autoimmunitat –per la seva semiallogenicitat- i també se n'han suggerit implicacions en la reparació tissular. En el nostre estudi vam detectar la presència de cèl.lules d'origen matern en pàncrees, amb una tendència a incrementar la seva freqüència en els casos de pacients amb DT1.

Una alternativa a la manca d'accés al teixit diana en la DT1 són els models experimentals de la malaltia. El ratolí NOD (no obès diabètic) és un model experimental de diabetis autoimmunitària àmpliament estudiat que desenvolupa una patogènesi amb característiques similars a la DT1 humana. Però tot i ser un bon model de DT1, el model NOD presenta diferències respecte la DT1 humana, com ara les característiques de la insulitis, una edat d'inici més tardana i una major incidència en femelles. En el nostre treball també vam

estudiar alteracions en l'òrgan diana en un model de DT1 derivat de la soca NOD. Una de les hipòtesis de la influència ambiental en la DT1 és coneguda com a hipòtesi vírica. Aquesta hipòtesi postula que les infeccions víriques serien l'element iniciador i/o desencadenant de la malaltia. L'interferó β (IFN β) és una citocina antiviral i proinflamatòria produïda per cèl.lules infectades. En un estudi previ, el nostre grup va generar i caracteritzar dos models murins transgènics que expressaven IFN β a les cèl.lules β , simulant els efectes d'una infecció vírica en fons genètics de susceptibilitat i resistència a la malaltia. En tots dos models es va observar l'IFN β promovia la DT1. En el model transgènic l'inici de la malaltia es dona de forma prematura, en una edat equivalent a l'adolescència. Aquest fet, juntament amb una incidència semblant en mascles i femelles, s'assimilen més a la DT1 humana. Per això en aquesta tesi també s'estudien alteracions a l'òrgan diana en el model NOD amb diabetis accelerada per IFN β . En la diabetis mediada per IFN β hi ha un major grau d'inflamació i un augment d'expressió de citocines i quimiocines proinflamatòries en pàncrees. Paral.lelament, l'IFN β induïx l'expressió de Reg2 (Reg, gen de regeneració) -factor de regeneració de cèl.lules β i autoantígen- a les cèl.lules β d'aquest model, en concordància amb un augment d'interleucina 6 (IL-6) (inductor de l'expressió de Reg) i una hiperplàsia insular.

En conjunt, els nostres resultats constitueixen la primera base de dades dels perfils d'expressió gènica en pàncrees de pacients amb DT1 i identifiquen noves alteracions a l'òrgan diana d'aquesta malaltia, juntament amb els resultats en models experimentals. A més, les nostres dades suggereixen nous enfocaments per l'estudi de la patogènesi de la diabetis tipus 1: els factors d'inflamació, immunitat innata, immunoregulació i regeneració alterats i les cèl.lules maternes són potencials dianes d'estudi per desenvolupar noves línies de recerca sobre aquesta malaltia.

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. DIABETIS MELLITUS TIPUS 1

1.1 CLÍNICA

La diabetis mellitus tipus 1 o DT1 és una malaltia metabòlica causada per la destrucció de les cèl·lules β dels illots de Langerhans. En la classificació de la diabetis mellitus proposada el 1997 pel Comitè d'Experts de la Associació Americana de Diabetis (ADA), es distingeix entre la diabetis tipus 1A, immunomediada, i la diabetis tipus 1B, idiopàtica [1]. La diabetis tipus 1A està causada per una destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β . La diabetis tipus 1B és d'etiologia desconeguda, els pacients d'aquesta malaltia no mostren evidències d'autoimmunitat. No obstant, en literatura habitualment es fa referència a DT1 per denominar la diabetis autoimmunitària, i així és com s'ha denominat al llarg de la memòria d'aquesta Tesi Doctoral. La DT1 se sol diagnosticar durant la infància o l'adolescència, tot i que també pot aparèixer en l'edat adulta. Les manifestacions clíniques de la malaltia apareixen després d'un període asimptomàtic (pre-diabetis) durant el qual progressa la resposta autoimmunitària contra les cèl·lules β . L'inici clínic de la malaltia sol acompanyar-se de símptomes com hiperglicèmia, glucosúria, polidipsia, poliúria, polifàgia, pèrdua de pes i cetoacidosi. Com a criteri diagnòstic, es consideren indicatius de diabetis mellitus almenys un dels factors següents: 1) símptomes de diabetis i nivells de glucosa en plasma ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l); 2) nivells de glucosa en plasma en dejú ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l); 3) nivells de glucosa en plasma ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) 2 hores després de realitzar el test de tolerància oral a la glucosa [2, 3]. Per confirmar el diagnòstic de DT1, es valora la presència d'autoanticossos anti-illot (ICA), anti-descaboxilasa de l'àcid glutàmic o GAD (GADA), anti-insulina (IAA) i anti-proteïna tirosina fosfatasa IA-2 (IA-2A) en sèrum. Com a paràmetre de seguiment de l'evolució dels pacients s'analitza la reserva pancreàtica d'insulina mitjançant els valors de C pèptid -fragment de la molècula d'insulina alliberat durant la seva síntesi-. També es valora el percentatge d'hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) com a mesura indicativa de la glicèmia mitjana dels darrers 2-3 mesos.

Quan es diagnostica la DT1 es calcula que ja s'han destruït el 80-95% de cèl·lules β [1], tot i que recentment s'ha demostrat que el percentatge de destrucció de les cèl·lules productores d'insulina a l'inici clínic de la malaltia correlaciona negativament amb l'edat [4]. La destrucció de la massa cel·lular β fa que els pacients diabètics produeixin insulina en quantitats insuficients. Per sobreviure necessiten l'administració exògena d'aquesta hormona. Com a tractament dels pacients amb DT1 s'utilitzen insulina humana recombinant o bé anàlegs sintètics de la insulina modificats d'absorció ràpida, intermèdia o lenta. Freqüentment s'utilitza com a teràpia una combinació d'aquests tipus per ajustar millor les necessitats insulíniques. La insulina s'administra normalment per via subcutània en dosis diàries múltiples. En pacients amb

un difícil control de la glicèmia, la insulina pot administrar-se a través de bombes d'administració contínua [5]. En pacients adults, s'estan realitzant assaigs per implantar el tractament amb insulina inhalada, tot i que se n'han observat efectes secundaris pulmonars lleus [6].

La insulina és l'hormona que controla la captació de glucosa per part dels teixits, i el seu dèficit provoca hiperglicèmia i una descompensació metabòlica. La hiperglicèmia en una malaltia crònica com la DT1 pot causar a llarg termini complicacions vasculars i neuropàtiques. Una de les complicacions microvasculars més freqüents és la retinopatia diabètica, en la qual es produeix un creixement anòmal de capil·lars a la retina que pot causar ceguesa. També es pot produir una nefropatia diabètica, a conseqüència d'una glicosilació de la membrana basal glomerular, que pot desembocar en una insuficiència renal. Finalment, una degeneració dels nervis perifèrics causa la neuropatia diabètica, una de les complicacions amb major associació a mortalitat i morbiditat en la DT1 [7]. També es poden produir complicacions vasculars en petites i grans artèries causant lesions a les extremitats inferiors. A més, s'hi associa l'aterosclerosi, que augmenta el risc de malaltia cardiovascular. Tot i així, el risc d'aparició de complicacions disminueix amb un control intensiu de la glicèmia [8]. La DT1 és una malaltia crònica que no acostuma a ser una causa de mortalitat directa, però les seves complicacions associades sí són causes importants de mortalitat i morbiditat. A més, tenen un impacte socioeconòmic considerable, ja que generen importants despeses hospitalàries i farmacològiques a la sanitat pública [9].

1.2. EPIDEMIOLOGIA

La incidència de la DT1 (casos nous per 100.000 habitants i any) varia segons l'àrea geogràfica. Les incidències dels països nord-europeus es troben entre les més altes del món (36,5 a Finlàndia). A l'extrem oposat hi trobem la Xina i Venezuela, amb les incidències més baixes (0,1) [10]. En general, la distribució segueix un gradient aproximat nord-sud. Una excepció notable és l'illa de Sardenya que, tot i estar situada a la zona mediterrània, té una incidència semblant a la dels països nòrdics (36,8). A més, s'ha observat que la incidència es manté alta en descendents de poblacions d'origen que van emigrar a d'altres regions d'Itàlia amb una incidència més baixa [11]. A més de la influència geogràfica també hi intervenen factors ètnics i racials: la DT1 és més freqüent en individus caucàsics que en individus nègrids o mongòlids. Durant la segona meitat del segle XX, la incidència de la DT1 a nivell mundial va augmentar de forma linial [12]. Estudis de l'evolució de la incidència mundial prediuen que l'any 2010 aquesta serà un 40% major que el 1998 [13]. L'edat en el moment del diagnòstic se situa al voltant de d'adolescència, amb un pic de diagnòstic entre els 12 i 14 anys, però existeix un segon pic en nens de 4-6 anys [14]. De fet, és en un rang d'edat d'entre 0 i 5 anys en el que l'augment de la incidència es preveu més notable [15]. El risc de desenvolupar DT1 és semblant en homes i dones [10], a diferència de la major prevalença en dones observada en d'altres malalties autoimmunitàries.

1.3. PREVENCIÓ I CURACIÓ

Fins al moment, centenars d'agents han estat testats en models experimentals *in vivo* de la malaltia, principalment en el ratolí no obès diabètic (NOD), per intentar prevenir o revertir-la mitjançant immunoteràpia. Alguns exemples són l'administració de citocines, la immunització amb autoantígens per crear tolerància, el tractament amb anticossos monoclonals i l'expansió de poblacions limfocitàries reguladores. Moltes d'aquestes estratègies retarden l'aparició de la malaltia i/o en disminueixen la incidència, però molt poques la reverteixen després de l'inici clínic [16]. Algunes d'aquestes immunoteràpies s'han assajat també en individus amb risc per prevenir la DT1 o en pacients per revertir-la. N'hi ha que s'han descartat pels seus efectes secundaris, com per exemple el tractament amb ciclosporina, un agent tòxic que produeix una immunosupressió no antígen-específica. L'assaig d'immunització amb insulina oral/subcutània (DPT-1, *Diabetes Prevention Trial-1*) tampoc ha donat resultats gaire esperançadors. Fins l'actualitat, l'únic tractament exitós en pacients de DT1 és l'administració d'anticossos monoclonals anti-CD3 (CD, grup de diferenciació) humanitzats, modificats per impedir el seu efecte mitogènic però mantenint la seva capacitat de senyalització [17]. Dades del model NOD indiquen que el mecanisme d'acció dels anticossos anti-CD3 és la inducció de l'apoptosi dels limfòcits T CD3⁺, afectant més als efectors que als reguladors, i induint una internalització transitòria de l'anticòs unit a CD3. Actuen de forma predominant a l'òrgan diana en un moment on la majoria de limfòcits T són específics per antígens dels illots, fet pel qual es considera que tenen un efecte específic d'antigen. La internalització de CD3 fa que els limfòcits T siguin temporalment incapaços d'interaccionar amb el seu antígen i emigrin fora dels illots, on es produeix una expansió de limfòcits T reguladors (Tregs) que creen una situació de tolerància a llarg termini. Els assajos multicèntrics realitzats mostren que en pacients de diagnòstic recent un tractament de 6 dies millora la capacitat secretora d'insulina durant un mínim de 5 anys. Per tant, a diferència d'altres immunosupressors, és un tractament molt curt però que genera una millora prolongada. Tot i així, cal tenir en compte que també pot tenir efectes secundaris transitoris com la reactivació del virus Epstein-Barr (EBV). A més, es desconeixen els seus efectes a molt llarg termini. La immunització de pacients de diagnòstic recent amb dosis baixes de GAD65 (autoantigen en DT1) recombinant sembla que també preserva la capacitat secretora d'insulina de les cèl·lules β i indueix un efecte protector mitjançant Tregs, tot i que aquesta teràpia està encara en fase d'assaig clínic [18].

2. ETIOLOGIA DE LA DT1

La DT1 és una malaltia multifactorial. L'etiologia de la DT1 és desconeguda però s'ha demostrat que hi ha un component genètic de susceptibilitat. A més, hi ha factors ambientals que modulen el procés en individus amb predisposició genètica.

2.1 FACTORS GENÈTICS DE SUSCEPTIBILITAT

La DT1 afecta freqüentment diferents membres d'una mateixa família. A més, la probabilitat de desenvolupar la malaltia és major si es té un familiar de primer grau afectat [19]. En un estudi comparatiu d'una cohort finlandesa de bessons on un d'ells era diabètic, es va observar que la probabilitat d'afectació del germà bessó era major si aquests eren univitelins (42,9%) que si eren bivitelins (7,4%) [20], fet que corrobora el component genètic. La DT1 és una malaltia de susceptibilitat poligènica. Fins al moment s'han descrit 24 *loci* de susceptibilitat a la DT1 en humans anomenats IDDM (**Taula 1**) i 27 *loci* en ratolí anomenats *Idd*. Alguns candidats a gens de susceptibilitat estan encara per confirmar. Actualment se segueixen identificant noves regions implicades i gens candidats (T1Dbase, www.t1dbase.org)

Taula 1. Loci de susceptibilitat a la DT1 en humans

LOCUS DE SUSCEPTIBILITAT	REGIÓ CROMOSÒMICA	GENS CANDIDATS
IDDM1	6p21.31--p21.32	<i>HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-A, HLA-B</i>
IDDM2	11p15.5	<i>INS</i>
IDDM3	15q26.1-q26.2	
IDDM4	11q12.2-q13.1	<i>GALN, FADD</i>
IDDM5	6q23.3-q25.3	<i>SUMO4</i>
IDDM6	18q21	<i>JK</i>
IDDM7	2q32.1	
IDDM8	6q26-q27	<i>TBP</i>
IDDM9	3q22.3-q26.2	
IDDM10	10p11-q11	<i>CREM, SDF1, MTPAP</i>
IDDM11	14q31.3-q312.13	
IDDM12	2q33.2-q33.3	<i>CTLA-4, CD28</i>
IDDM13	2q35	<i>NRAMP1, IGFBP5</i>
IDDM14	6q21	
IDDM15	14q32.3	
IDDM16	10q25.1q26.11	<i>IGH@</i>
IDDM17	5q33.3	
IDDM18	5q31.2-q35.1	<i>IL12B</i>
IDDM19	2q24.3	<i>IFIH1</i>
IDDM20	12q24	
IDDM21	6q25	
IDDM22	3p21.31	<i>CCR5</i>
IDDM23	4q27	
IDDM24	10q23.31	
	18p11	<i>PTPN2</i>
	22q13	<i>C1QTNF6</i>
	12q13.1-q13.3	<i>CYP27B1</i>
	16p13	<i>CLEC16A</i>
	1p13	<i>PTPN22</i>
	18p11	<i>PTPN2</i>
	4q26-q27	<i>IL2, IL21</i>
	6q15	<i>BACH2</i>
	10p15	<i>PRKCQ, IL2RA</i>
	15q24	<i>CTSH</i>
	Xp13p11	<i>FOXP3</i>

Els antígens leucocitaris humans (HLA) són molècules encarregades de la presentació antigènica de pèptids al receptor dels limfòcits T (TCR). Les molècules d'HLA de classe I presenten pèptids endògens als limfòcits T CD8⁺. De forma atípica, també poden presentar pèptids exògens captats i processats per cèl.lules presentadores d'antigen (APCs), fet que es coneix com a presentació encreuada. Les molècules d'HLA de classe I s'expressen en totes les cèl.lules excepte en eritròcits -cèl.lules no nucleades-, algunes cèl.lules infectades o neoplàsiques i la majoria de neurones del SNC (algunes n'expressen nivells baixos). Les

molècules d'HLA de classe II presenten normalment pèptids exògens als limfòcits T CD4⁺, tot i que també poden presentar pèptids endògens, per exemple d'autoantígens. L'HLA de classe II s'expressa en APCs i cèl.lules epitelials tímiques i és induïble en d'altres tipus cel.lulars mitjançant citocines. Els gens HLA són altament polimòrfics. Polimorfismes en aquests gens podrien produir variacions en la presentació d'autoantígens. Els gens HLA es troben agrupats a la regió cromosòmica 6p21.3, en una regió de susceptibilitat a la DT1 (IDDM1) [21]. Els polimorfismes en l'HLA contribueixen aproximadament al 50% de la susceptibilitat genètica a la DT1 [22]. L'associació més forta entre al.lels de susceptibilitat i la DT1 es troba en gens d'HLA de classe II (*HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* i *HLA-DR*). Per exemple, s'han descrit haplotips de predisposició a la DT1 com DR4-DQB1*0302 (DR4-DQ8) i DR3-DQB1*0201 (DR3-DQ2). En canvi, l'haplotip DR2-DQB1*0602 és protector. Els individus heterozigots pels dos haplotips de susceptibilitat (DR3/DR4-DQ8) tenen major risc de desenvolupar DT1. La predisposició d'alguns haplotips es pot explicar degut a diferències estructurals de les molècules de classe II. La posició 57 de la molècula d'HLA-DQB1 influeix a la predisposició a la DT1: aminoàcids com Ala, Val i Ser en aquesta posició s'associen a al.lels predisposants, mentre que un Asp, s'associa en general a protecció [23]. Aquesta característica també s'observa en el ratolí NOD, model de DT1. Aquest model presenta un aminoàcid Ser57 a la molècula I-A β (complex major d'histocompatibilitat o MHC de classe II), a diferència de l'Asp57 present en soques resistents a la DT1 [24]. Finalment, alguns polimorfismes en gens d'HLA de classe I (*HLA-A* i *HLA-B*) també contribueixen a la predisposició a la DT1, destacant l'al.lel HLA-B*39 [25].

El segon *locus* de susceptibilitat a la DT1 més important està situat a més enllà de l'extrem 5' del promotor del gen de la insulina (*INS*) [26], al cromosoma 11p15.5 (IDDM2). Existeixen 3 al.lels del promotor amb diferent llargada de repeticions en tàndem de nombre variable (VNTR). La variant més curta és predisposant i la més llarga, protectora. El polimorfisme actua en *cis* influïent en la transcripció d'àcid ribonucleic (RNA) missatger (mRNA) d'*INS*. La variant curta es transcriu en major quantitat en pàncrees i en menor quantitat al timus. Aquest fet sembla estar relacionat amb la tolerància central dels limfòcits T al timus [27].

Un altre locus de susceptibilitat es troba al gen *PTPN22* [28], a la regió 1p13. *PTPN22* codifica per la tirosina fosfatasa limfoide Lyp, que regula negativament la senyalització del receptor dels limfòcits T (TCR) i la seva activació. Lyp interacciona amb el supressor de quinases Csk i inhibeix la senyalització de Lck. S'ha descrit un polifimorfisme d'un sol nucleòtid (SNP) al gen *PTPN22* associat a la DT1. Aquest gen candidat també s'ha associat a altres malalties autoimmunitàries [29].

Un altre *locus* associat a la DT1 és el de *CTLA-4* (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), situat a la regió cromosòmica 2q33 (IDDM12). *CTLA-4* és una molècula de superfície dels limfòcits T que interacciona amb lligands de la família B7, igual que la molècula co-estimuladora CD28. Al contrari que CD28, *CTLA-4* emet una senyal inhibidora, moderant la senyalització de CD3 quan el TCR interacciona amb el complex HLA-antigen. Polimorfismes de *CTLA-4* estan

associats a la DT1 i a malalties autoimmunitàries de la tiroide [30, 31]. El polimorfisme amb una major associació genera un haplotip de susceptibilitat associat a una menor producció de CTLA-4 soluble. En el ratolí NOD també s'ha descrit un SNP a l'exó 2 de *CTLA-4* (Idd5.1), generant una nova variant sense el domini d'unió a B7.

La cadena α del receptor de la interleucina 2 (*IL2RA*) -CD25- és un altre gen candidat a la susceptibilitat a la DT1 [32]. S'han descrit 2 SNPs associats a la DT1, un dels quals genera un al·lel susceptible associat a una menor producció d'IL-2RA soluble [33].

IFIH1 (*IFN-induced with helicase C domain 1*) codifica per una helicasa que reconeix RNA viral i indueix una resposta antiviral i pro-apoptòtica en cèl·lules infectades. És un gen de resposta a IFN- β . S'ha trobat associació entre alguns polimorfismes d'*IFIH1* (a la regió 2q24.3, IDDM19) i la DT1 [34]. A més, existeix una correlació entre genotip i expressió d'aquesta molècula: hi ha major expressió de mRNA d'*IFIH1* en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) de pacients homozigots per l'al·lel predisposant que en homozigots per l'al·lel protector [35]. Polimorfismes en aquest gen antiviral concorden, encara que de forma indirecta, amb la hipòtesi que relaciona les infeccions víriques amb la DT1.

El gen *CYP27B1* codifica per l'enzim 1α -hidroxilasa, que genera la forma activa de la vitamina D ($1\alpha,25$ -dihidroxitamina D). Aquest gen està situat a la regió 12q13.1-q13.3 i se n'han descrit 2 polimorfismes associats a la DT1 [36]. La vitamina D sembla tenir un efecte protector en la DT1 [37], a més de propietats immunomoduladores.

També s'ha trobat una associació del gen *CLEC16A* (cromosoma 16p13.2) amb la DT1. Encara que la seva funció és desconeguda, la predicció de la seqüència proteica indica que té un domini lectina de tipus C. A més, s'expressa principalment en cèl·lules del sistema immunitari [38].

Un altre *loci* de susceptibilitat recentment identificat, situat a la regió 18q11, correspon al gen *PTPN2* (*phosphotyrosine-protein phosphatase, non-receptor 2*). *PTPN2* és una fosfatasa que regula l'apoptosi de les cèl·lules β induïda per citocines [39].

En l'actualitat s'estan detectant noves regions associades a la DT1. En estudis d'associació del genoma complet (GWA, *genome-wide association studies*), s'analitzen a gran escala milers de SNPs mitjançant *arrays* d'oligonucleòtids. Aquest tipus d'anàlisi permet identificar contínuament noves regions de susceptibilitat a la DT1 [40]. La majoria d'aquestes regions contenen gens candidats relacionats amb el sistema immunitari.

2.2. FACTORS AMBIENTALS

A més de la predisposició genètica hi ha un component ambiental que contribueix al desencadenament de la DT1. Aquest fet es desprèn per exemple d'estudis que demostren que en bessons univitelins, que comparteixen el 100% dels haplotips, la concordància de la DT1 és menor del 50% [20]. Altres evidències de l'efecte ambiental són la variabilitat geogràfica de la incidència i el ràpid augment d'aquesta durant les darreres dècades, suggerint un augment en

la pressió ambiental en individus predisposats. Alguns estudis sobre migració reforcen la idea de la influència ambiental. Un exemple és el d'un grup de nens del Paquistán (zona amb una incidència baixa de DT1) que van migrar al Regne Unit i van desenvolupar DT1 amb una incidència semblant a la del país d'acollida [41]. La incidència fluctua també segons l'estació de l'any, sent més alta durant la tardor i l'hivern [42]. Alguns dels factors ambientals que s'han associat a la DT1 són l'exposició a agents infecciosos, la dieta, els nivells de vitamina D, factors psicossocials com l'estrès, les toxines, etc. com es detalla tot seguit:

2.2.1 Agents infecciosos i DT1

Fins l'actualitat no s'ha pogut identificar cap agent infecció que sigui causant directe de DT1 en humans, però existeixen evidències indirectes de la influència de certs patògens en malalties autoimmunitàries, entre elles la DT1. S'ha hipotetitzat que les infeccions víriques podrien ser tant l'element iniciador com el desencadenant de l'autoimmunitat contra la cèl.lula β . Paral·lelament, hi ha autors que atribueixen a certs microorganismes un efecte protector de la DT1. Com s'explica a continuació, aquestes dues hipòtesis no són mútuament excloents.

2.2.1.1. Virus

Algunes dades epidemiològiques correlacionen les infeccions víriques i el desencadenament de DT1. Per exemple, s'ha detectat una major freqüència d'infeccions per enterovirus en nens amb anticossos anti-illot (ICAs) [43]. D'altres dades a favor de la hipòtesi vírica de la DT1 són la detecció d'immunoglobulines (Ig) de tipus IgM contra epítops de coxsackievirus B, virus de la parotiditis, virus de la rubèola i citomegalovirus [44]. A més, s'ha descrit la presència d'IFNs de tipus I -citocines activirals- en pàncrees de pacients diabètics [45-47]. Malgrat aquestes evidències, és difícil assegurar que un virus és l'element iniciador de la DT1 degut al llarg període de temps des de l'inici de l'autoimmunitat fins que es diagnostica la malaltia.

S'han suggerit alguns mecanismes per explicar l'associació dels virus amb la DT1 [48, 49]: 1) el mimetisme molecular, un dels més acceptats, suggereix la reactivitat creuada entre epítops de proteïnes víriques i autoantígens de la DT1. S'ha descrit, per exemple, una reacció creuada entre epítops de GAD i coxsackievirus, citomegalovirus [50], virus de la rubèola [51] i rotavirus, que també té epítops amb reactivitat creuada amb IA-2; 2) La disseminació d'epítops de les cèl.lules β alliberats després d'una infecció vírica. Alguns epítops crítics de les cèl.lules β prèviament emmascarats serien processats i presentats de forma diferent després d'una infecció; 3) La inflamació de l'òrgan diana després d'una infecció vírica activaria i atrauria limfòcits T autoreactius de forma colateral. De forma relacionada, la "hipòtesi del camp fèrtil" proposa que una infecció vírica/inflamació als illots crearien, mitjançant la sobreexpressió de MHC de classe I, un camp fèrtil perquè les cèl.lules autoreactives preexistents destruïssin les cèl.lules β [52]; 4) Els superantígens són molècules víriques o bacterianes que interaccionen a MHC II i a cèl.lules T policlonals, activant-les de forma inespecífica. Aquests s'han associat a la

DT1 en el cas dels retrovirus endògens; 5) La destrucció citolítica directa de les cèl·lules β infectades (tot i que aquest mecanisme no sembla compatible amb el llarg període asimptomàtic de la DT1).

Diferents virus s'han associat a la DT1 fins al moment. El virus de la parotiditis -o galteres- (família *Paramyxoviridae*), que afecta principalment nens, va ser un dels primers virus associats a la malaltia. S'han descrit casos d'aparició de DT1 just després d'una infecció per aquest virus [53]. A més, s'han detectat ICAs en el sèrum de nens amb galteres [54]. Un altre virus associat a la DT1 és el virus de la rubèola (gènere *Rubivirus*, família *Togaviridae*) en la síndrome de la rubèola congènita (CRS). El 12-20% dels afectats desenvolupen DT1 abans dels 20 anys [49]. A més, el 50-80% d'afectats per CRS diabètics i el 20% d'afectats per CRS no diabètics presenten autoanticossos anti-illot o anti-insulina (IAA) [55]. La infecció per citomegalovirus (CMV) (família *Herpesviridae*) és bastant comuna tot i que normalment no causa símptomes. En pacients amb DT1 s'ha detectat d'àcid desoxiribonucleic (DNA) de CMV en major proporció que en controls. També s'ha vist una associació entre presència de CMV (DNA del virus i anticossos anti-CMV) i ICAs [56]. Un altre virus de la mateixa família com el virus d'Epstein Barr (EVB) s'ha relacionat amb la DT1 ja que un pèptid de la regió Asp57 de la molècula DQ β es repeteix sis vegades en un epítot del virus. Dos pacients amb anticossos contra aquest epítot van desenvolupar DT1 [57]. El retrovirus endògen IDDMK_{1,2}22 va ser aïllat del sobrenadant d'illots d'un pacient amb DT1. Es va observar que aquest virus tenia activitat superantigen, produint una activació policlonal de limfòcits T restringits per V β 7, una família enriquida en dos pàncrees de pacients amb DT1 [58]. Però aquest va ser un fet ocasional i no s'han pogut demostrar les seves implicacions en la patogènesi de la DT1. Els rotavirus (família *Reoviridae*), causa principal de gastroenteritis en nens, podrien contribuir al desencadenament de la DT1 mitjançant mimetisme molecular entre la proteïna vírica VP7 i l'autoantigen IA-2. En un estudi prospectiu de nens amb predisposició genètica s'ha vist una associació temporal entre la seroconversió per rotavirus i l'augment d'IA-2A, GADA i IAA [59].

Els virus que més s'han relacionat amb la DT1 són els enterovirus (família *Picornaviridae*), grup que inclou els coxsackievirus A i B, echovirus i poliovirus. En un estudi prospectiu es va observar major freqüència de positivitat per RNA d'enterovirus en sèrum d'individus prediabètics en comparació amb controls [60]. També s'han relacionat les infeccions per enterovirus amb la posterior aparició d'ICAs [61]. El coxsackievirus B és el subgrup més clarament associat a la DT1, particularment el serogrup B4. Els coxsackievirus B mostren tropisme cap a les cèl·lules β , són capaços d'infectar-les *in vitro* i alterar-ne la funció secretora d'insulina [62, 63]. S'han detectat anticossos IgM contra coxsackievirus en el 33% de pacients a l'inici clínic de la DT1 [44]. També s'han observat respostes de limfòcits T contra coxsackievirus en pacients diabètics [64]. En una ocasió es va poder aïllar el coxsackievirus B4 del pàncrees d'un pacient diabètic a l'inici clínic de la malaltia. La inoculació d'aquest virus a ratolins de la soca SJL els va induir DT1 [65]. Més recentment s'ha descrit la presència de proteïnes de

coxsackievirus B4 als illots de tres pacients diabètics amb un infiltrat leucocitari format principalment per cèl.lules citocides naturals (NK) [63]. Els mecanismes patogènics proposats són el mimetisme molecular (per exemple entre la proteïna PC-2 i GAD), l'activació colateral de cèl.lules T autoreactives després d'una inflamació local dels illots i la destrucció citolítica per infecció de les cèl.lules β .

En la patogènesi de la DT1 fulminant es postula que les infeccions víriques podrien ser-ne l'element desencadenant, ja que l'inici clínic sol anar acompanyat de símptomes d'infecció respiratòria i/o gastrointestinal. La DT1 fulminant és una forma de diabetis molt agressiva descrita durant els darrers anys i confinada quasi exclusivament al Japó. Cursa clínicament amb hiperglicèmia i cetoacidosis però presenta característiques diferents de la DT1 clàssica, algunes de les quals fan difícil classificar-la dins la DT1A (immunomediada) o la DT1B [66]. En la DT1 fulminant es destrueix quasi la totalitat de la massa cel.lular β en un període aproximat d'una setmana. La presència d'insulitis s'ha observat en mostres de pacients a l'inici clínic però no en mostres de biòpsies de pacients uns mesos després de l'inici. Els pacients amb DT1 fulminant no presenten autoanticossos en sèrum contra antígens dels illots (amb l'excepció de títols baixos de GADA en una minoria de pacients). En canvi, sí presenten un augment dels nivells d'enzims exocrins. A més, la majoria de pacients presenten anticossos contra enterovirus. Recentment s'ha detectat la presència de proteïnes d'enterovirus en cèl.lules endocrines i algunes acinars en pacients amb DT1 fulminant [67], fet que reforça la idea de les infeccions per enterovirus com a origen de la malaltia.

2.2.1.2. Bacteris

Alguns bacteris com *Mycobacterium avium* i *Salmonella typhimurium* poden prevenir la diabetis en el ratolí NOD [68]. El mecanisme proposat és la inducció per part d'aquests microorganismes d'una resposta reguladora a través de cèl.lules dendrítiques, cèl.lules T reguladores i producció de citocines anti-inflamatòries. En humans, *Mycobacterium avium* subespècie *paratuberculosis* s'ha associat també a la DT1, detectant-se proteïnes d'aquesta espècie més freqüentment en el sèrum de pacients amb DT1 que en controls [69].

2.2.1.3. Helmints

L'exposició de ratolins NOD a helmints de l'espècie *Schistosoma mansoni* té un efecte protector de la DT1, fins i quan se'ls exposa a extractes dels helmints. Aquests extractes poden modular el sistema immunitari mitjançant diferents mecanismes: induint les cèl.lules T reguladores i les cèl.lules NKT i desviant el tipus de resposta de citocines produïdes per cèl.lules dendrítiques (DCs) cap a un perfil Th2 (Th, limfòcit T col.laborador) [68, 70]. Altres helmints gastrointestinals com *Trichinella spiralis* i *Heligmosomoides polygyrus* també són protectors de la DT1 en el model NOD [71].

2.2.1.4. Hipòtesi de la higiene

Durant les últimes dècades, als països desenvolupats s'han reduït les malalties infeccioses gràcies a millores higièniques i sanitàries, als programes de vacunació i a l'ús d'antibiòtics. Els països desenvolupats són els que tenen en general una major incidència de DT1. En un estudi es va detectar una relació negativa inversa entre infeccions i resposta a al·lèrgens en dues poblacions genèticament relacionades i d'àrees geogràfiques adjacents, però amb importants diferències socioeconòmiques i culturals [72]. La "hipòtesi de la higiene" associa l'exposició a agents infecciosos durant els primers anys de vida a un menor risc de desenvolupar atòpia i autoimmunitat [73]. En un model animal d'autoimmunitat com és el ratolí NOD, la incidència de DT1 és major quan la soca es troba en condicions lliures de patògens específics (SPF). La hipòtesi de la higiene proposa que el sistema immunitari seria "educat" per diferents estímuls antigènics a través de les infeccions i seria capaç de poder controlar les respostes contra al·lèrgens i/o autoantígens. Els principals mecanismes proposats són els següents: 1) la competició d'autoantígens/al·lèrgens amb antígens infecciosos pels senyals d'homeostasi dels limfòcits i per citocines; 2) la inducció d'una resposta immunoreguladora enfront a l'agent infecciosos que regularia també l'autoimmunitat; 3) la regulació de la resposta antiviral, després d'eliminar el virus, que eliminaria els limfòcits autoreactius de forma colateral; 4) l'activació d'una resposta reguladora mitjançant receptors tipus Toll (TLRs). Aquestes respostes podrien estar mediatas Tregs a través del factor de creixement i transformació β (TGF- β), cèl.lules NKT i cèl.lules dendrítiques (DCs) produïnt citocines de tipus Th2, factor de necrosi tumoral α (TNF α) i PD1-L [69, 74, 75].

2.2.1.5. Microbiota intestinal

Alteracions en la microbiota intestinal podrien estar associades a la DT1, com suggereixen estudis sobre l'efecte de probiòtics en models de DT1 [76]. La microbiota intestinal s'ha relacionat amb altres factors que semblen estar alterats en DT1: la permeabilitat intestinal (alterada en el model de rata *BioBreeding* i en individus amb predisposició genètica) i el sistema immunitari mucosal de l'intestí (cèl.lules T reguladores, expressió de MHC II i molècula d'adhesió intercel.lular 1 o ICAM-1). La interacció entre tots 3 factors s'ha proposat com a condicionant en la DT1 [77]. En el model NOD, la immunitat innata pot modificar la composició de la microbiota intestinal, i modificar la predisposició a la DT1. El ratolí NOD *knockout* per MyD88 –adaptador de diversos TLRs– no desenvolupa DT1 en condicions SPF, però sí en condicions totalment lliures de microorganismes (GF) [78].

2.2.2. Dieta

Diversos estudis suggereixen una influència de la dieta en la predisposició a la DT1. Des de fa dècades s'ha constatat un efecte predisposant a la DT1 de l'alimentació amb llet de vaca durant els primers mesos de vida. D'una banda això podria ser degut a la manca de factors protectors presents en la llet humana (anticossos, factors de creixement, citocines), però també

hi ha components en la llet de vaca que semblen promoure la DT1. S'ha observat que existeix mimetisme molecular entre l'epítip ABBOS de l'albumina bovina i l'autoantigen ICA69, però no se n'ha demostrat l'efecte patogènic. En pacients diabètics hi ha una major quantitat d'anticossos contra β -lactoglobulina –proteïna absent en la llet humana-, albumina bovina, caseïna i altres proteïnes de la llet de vaca [79]. A més, dietes amb caseïna hidrolitzada poden prevenir la DT1 en el ratolí NOD i la rata BB i reduir la freqüència d'autoanticossos en nens amb risc de DT1 [80].

La gliadina (component principal del gluten) i la transglutaminasa són proteïnes contra les quals existeixen autoanticossos en pacients amb malaltia celíaca. A més, alguns pacients diabètics tenen autoanticossos contra gliadina i transglutaminasa. De fet, la celiaquia i la DT1 són dues malalties autoimmunitàries amb un component genètic comú, i la prevalença de celiaquia en pacients diabètics és major que en la població en general. En dos estudis diferents s'ha vist que l'exposició al gluten durant els primers mesos de vida augmenta el risc d'aparició d'autoanticossos en nens amb predisposició genètica a la DT1 [80]. Les dietes riques en gluten també promouen la DT1 en els models experimentals NOD i BB [80].

2.2.3. Vitamina D

La vitamina D sembla tenir un paper protector en la DT1. Existeixen dues fonts de vitamina D: la síntesi endògena a la pell, induïda per l'exposició a la llum solar (UVB), i l'obtenció a través de certs aliments (peix, llet, ous). La seva forma activa $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se sintetitza després de dos passos enzimàtics d'hidroxilació [81]. La suplementació de vitamina D durant la infància s'ha associat a una reducció en el risc de desenvolupar DT1 [37]. També s'ha observat una correlació inversa entre els nivells d'UVB (font principal de vitamina D) i la incidència de T1D en diferents regions del món [82]. Aquesta vitamina té un efecte protector de la DT1 en ratolins NOD [81] i en altres models de malalties autoimmunitàries. La vitamina D té efectes immunomoduladors com per exemple la inducció de DCs amb un fenotip tolerogènic [83].

2.2.4. Toxines

Alguns bacteris del gènere *Streptomyces* infecten tubercles i produïr toxines que es poden adquirir a través de la dieta. Algunes d'aquestes toxines, com la bafilomicina A1, tenen un efecte tòxic sobre les cèl.lules β [80, 84]. A més, els nitrits i nitrats derivats de la dieta poden ser transformats en compostos N-nitrosos (nitrosamines i nitrosamides), que actuen com a toxines i s'han associat a un major risc de DT1 en alguns estudis [79].

2.2.5. Factors psicossocials

Un factor psicossocial com l'estrès s'ha associat també a la DT1. S'ha documentat una associació entre situacions familiars traumàtiques o estrès parental i la presència d'IA-2A I GADA en nens d'un any d'edat [85]. L'estrès altera els nivells hormonals de cortisol i

catecolamines, i condiciona la senyalització nerviosa del sistema immunitari. També s'ha relacionat amb una major demanda d'insulina, causant un estrès addicional a la cèl.lula β .

2.3. FACTORS ESTOCÀSTICS

El repertori immunològic d'un individu està format per milions de clons de limfòcits amb diferent especificitat antigènica, generats de forma estocàstica i variable entre individus. Els receptors dels limfòcits T i B (TCR i BCR) estan formats per diferents regions codificades per gens organitzats en segments gènics [86]. Els segments corresponents a les regions variables, de diversitat i d'unió recombinen i reordenen a l'atzar, generant BCRs i TCRs amb diferents especificitats. A més, existeixen mecanismes que n'augmenten la diversitat durant la recombinació, com la generació dels anomenats "nucleòtids P" i l'addició d'un nombre variable de nucleòtids coneguts com a "nucleòtids N" als extrems dels segments mitjançant l'enzim deoxinucleotidil transferasa terminal o TdT. Durant el desenvolupament dels limfòcits B es dona un mecanisme addicional de diversitat, conegut com a hipermutació somàtica, que genera mutacions puntuals a l'atzar a la regió variable de les Igs després del reconeixement d'antigen. Tots aquests mecanismes es donen de forma estocàstica i condicionen el repertori d'un individu i, per tant, la presència de cèl.lules autoreactives dins d'aquest. Les diferències en el repertori podrien justificar el fet que la incidència de l'autoimmunitat en models experimentals amb individus genèticament idèntics no fós del 100%.

3. ANATOMIA I FISIOLOGIA DEL PÀNCREES I DELS ILLOTS DE LANGERHANS

El pàncrees és un òrgan amb tres parts diferenciades: el cap (més pròxim al duodè), el cos i la cua, adjacent a la melsa. Durant el desenvolupament embrionari, es forma a partir de dos primordis de teixit endodèrmic (dorsal i ventral) que finalment es fusionen. El pàncrees adult està format per tres teixits principals: el teixit exocrí, l'endocrí i els ductes pancreàtics. El teixit exocrí constitueix la major part del pàncrees (99%) i està format per cèl.lules secretores agrupades en acins. La seva funció és la producció d'enzims digestius, que s'emmagatzemen en grànuls i se secreten al duodè. Alguns enzims digestius com l'amilasa, lipasa, desoxiribonucleasa (DNasa) i ribonucleasa (RNasa) són secretats en la seva forma activa. D'altres, com la tripsina, quimiotripsina, elastasa i carboxipeptidasa, se secreten en forma de precursors inactius o zimògens, com a mecanisme protector per al propi òrgan.

La part endocrina del pàncrees es troba organitzada en petites glàndules anomenades illots de Langerhans. Els illots pancreàtics van ser descrits per primera vegada pel patòleg alemany Paul Langerhans l'any 1869. Representen tan sols un 1% de la massa total del pàncrees i es troben dispersos enmig del teixit exocrí [87]. Es calcula que hi ha aproximadament un milió d'illots en un pàncrees humà i uns 500 en un pàncrees de ratolí. Cada illot sol estar format per unes 1000 cèl.lules de mitjana, tot i que hi ha bastanta variabilitat. Els

illots pancreàtics estan formats per diferents tipus cel.lulars endocrins que secreten hormones relacionades amb la homeostasi de la glucosa:

- les cèl.lules β , productores d'insulina
- les cèl.lules α , productores de glucagó
- les cèl.lules δ , que secreten somatostatina
- les cèl.lules PP, que produeixen polipèptid pancreàtic
- les cèl.lules ϵ , secretores de ghrelina

L'estructura i la composició dels illots varia lleugerament entre espècies. Els illots murins tenen una estructura compartimentada. Les cèl.lules β són la població majoritària, representen el 70-80% de cèl.lules endocrines. Formen el nucli central de l'illot i estan envoltades per un mantell més superficial de cèl.lules α (20%), δ (10%), PP (5%) i ϵ (1%). En els illots humans la distribució de les cèl.lules endocrines és més a l'atzar i no presenten subdivisions anatòmiques [88]. A més, el percentatge de cèl.lules β és menor (55-60%) i el de cèl.lules α és major (30-40%). A la **Figura 1** es representa l'estructura dels illots pancreàtics humans i murins.

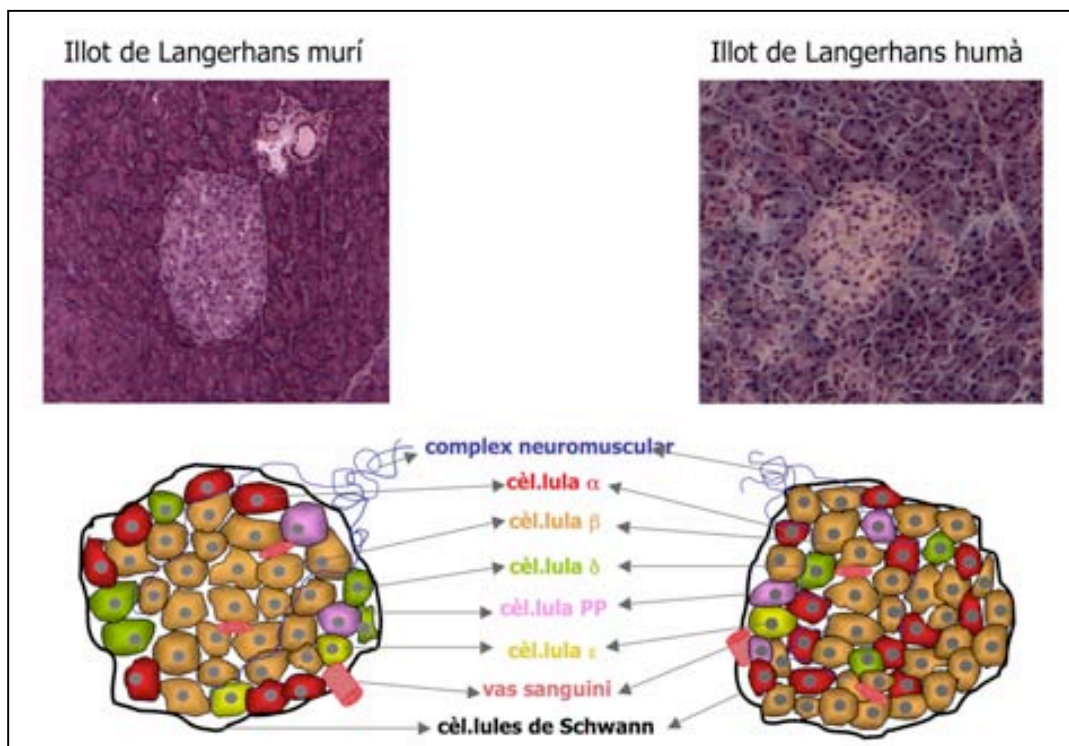


Figura 1. Estructura de l'illot de Langerhans murí i humà. La part superior correspon a imatges d'illots de Langerhans de seccions de pàncrees tenyides amb H/E. A la part inferior es mostra una representació esquemàtica de la distribució dels seus tipus cel.lulars principals.

Les **cèl.lules β** produeixen i secreten insulina en resposta a la glucosa, hormona que augmenta la captació de glucosa per part dels teixits. Les cèl.lules β , a través del transportador

GLUT2, detecten la glucosa extracel.lular. Aleshores es posen en marxa mecanismes que regulen l'activitat elèctrica de la cèl.lula, augmenta el calci intracel.lular i s'alliberen els grànuls que contenen insulina. La insulina és una molècula de 6kDa formada per dues cadenes α i β unides per 3 ponts disulfur. La insulina madura es genera a partir d'un precursor (preproinsulina), del qual s'escindeix un pèptid senyal i s'obté la proinsulina. Aquesta, és internalitzada en els grànuls secretors de les cèl.lules β , on es processa per generar les dues cadenes α i β i un fragment anomenat C pèptid. Com que la insulina i el C pèptid es produeixen en proporció 1:1, el nivell de C pèptid s'utilitza com a mesura de la capacitat secretora d'insulina.

Les **cèl.lules α** sintetitzen i secreten glucagó. Les accions del glucagó són oposades a les de la insulina: se secreta quan hi ha hipoglucèmia i promou la glucogenolisi hepàtica. L'alliberació de glucagó està regulada per insulina, somatostatina, alguns nutrients i pel sistema nerviós [89]. Les **cèl.lules δ** són les productores de somatostatina. Aquesta hormona inhibeix la secreció d'insulina i de glucagó. Les **cèl.lules PP** secreten polipèptid pancreàtic, un pèptid de la família del neuropèptid Y la funció del qual encara no està ben definida. El darrer tipus cel.lular endocrí que s'ha descrit són les **cèl.lules ϵ** , que produeixen ghrelina. Són una població minoritària i se situen a la perifèria dels illots. A la ghrelina se li atribueix una funció reguladora de la secreció d'insulina. A part de la regulació paracrina per part de les pròpies hormones insulars, la funció endocrina de l'illot està regulada per altres circuits hormonals i neuronals.

Els illots de Langerhans estan intensament vascularitzats: el seu flux sanguini representa el 10% del total del pàncrees [87]. Cada illot està irrigat per almenys una arteriola, que entra al nucli central dels illots a través de discontinuïtats del mantell. Formen una xarxa de capil.lars fenestrats que irriga l'illot del centre cap a la perifèria, on connecten amb les vècules col.lectores. En la majoria dels illots el flux sanguini va del nucli de cèl.lules β cap a l'exterior, però en alguns va des d'un extrem a l'altre de l'illot, independentment de la distribució dels tipus cel.lulars [90]. La majoria de cèl.lules endocrines es troben associades als vasos sanguinis dels illots [88], i secreten les hormones directament a la circulació. Els illots estan innervats per una xarxa de fibres nervioses que s'uneixen en un pol de l'illot formant el complex neuroinsular [91]. Aquestes innervacions formen sinapsis amb les cèl.lules endocrines i en controlen la seva activitat. A més, l'illot està envoltat per una capa de cèl.lules de Schwann [92].

4. AUTOIMUNITAT CONTRA LA CÈL.LULA β EN LA DT1 HUMANA

4.1. LA RESPOSTA AUTOIMMUNITÀRIA

El sistema immunitari respon fisiològicament generant una resposta específica contra molècules externes o perilloses per l'organisme, per exemple en el context de les infeccions o els càncers. En alguns individus però, el sistema immunitari perd la capacitat de distingir entre allò propi i allò no propi/perillós i respon contra proteïnes pròpies (autoantígens). Aquest tipus

de resposta causa un dany i/o disfunció cel·lular, que pot desembocar en malalties autoimmunitàries. Cal aclarir però que no tots els individus amb autoimmunitat arriben a desenvolupar símptomes clínics. L'autoimmunitat és una resposta immunitària que es dona contra antígens del propi individu. Les malalties autoimmunitàries es defineixen clàssicament segons el lloc d'expressió dels antígens afectats, les *malalties autoimmunitàries òrganoespecífiques* -en les que l'autoimmunitat es restringeix a un teixit concret- i les *malalties autoimmunitàries sistèmiques* -en les que l'expressió dels antígens afectats té un abast més general-. Aquesta classificació però s'utilitza cada vegada menys, ja que s'ha observat que algunes malalties autoimmunitàries òrgano-específiques realment tenen un espectre d'afectació més ampli. En la DT1, malaltia autoimmunitària considerada clàssicament òrganoespecífica, la resposta va dirigida principalment contra antígens de les cèl·lules β dels illots pancreàtics. Aquesta resposta està mediada per un component cel·lular (limfòcits T) i un component humoral (autoanticossos), que n'indiquen l'etiologia autoimmunitària. Això ho corrobora la millora observada després del tractament amb immunosupressors sistèmics, com la ciclosporina, tot i que aquesta no s'utilitza com a teràpia degut als seus efectes secundaris nefrotòxics i d'afectació del sistema immunitari [93]. La transmissió de la DT1 a través de limfòcits és una altra evidència d'autoimmunitat. En la DT1 humana es va descriure la transmissió de la malaltia entre dos germans amb HLA idèntic després d'un transplantament de medulla òssia [94]. Les malalties autoimmunitàries sovint es manifesten de forma associada en un mateix individu o família. Els pacients amb DT1 desenvolupen amb major freqüència tiroïditis autoimmunitària, celiaquia i malaltia d'Addison. Aquestes malalties tenen factors genètics predisposants en comú. A més, de vegades es donen alhora en pacients amb síndromes poliglandulars autoimmunitaris [95].

4.2. AUTOANTÍGENS EN DT1

Un autoantigen és un antigen propi de l'individu contra la qual es genera una resposta immunitària. La resposta immunitària adaptativa contra els autoantígens pot estar mediada per limfòcits T i/o per anticossos que els reconeixen de forma específica. En la DT1 es produeix una resposta contra autoantígens dels illots pancreàtics, alguns dels quals, com insulina o glucosa-6-fosfatasa específica d'illot (IGRP), són exclusius de cèl·lules β . D'altres, en canvi, són neuroendocrins (GAD, IA-2, S100 β) o bé neuronals (proteïna glial àcida fibril·lar o GFAP [96]). La insulina (o la proinsulina) es postula com a possible autoantigen primari en la DT1 [97], ja que és específic de cèl·lules β i els autoanticossos que la reconeixen específicament solen ser els primers en aparèixer. A la **Taula 2** es mostra una recopilació dels autoantígens identificats en la DT1 fins al moment.

Taula 2. Autoantígens en DT1

NOM(S)	LLOC D'EXPRESSION	FUNCIÓ	DT1	RESPOSTA
insulina/proinsulina	Cèl.lules β	Homeostasi de la glucosa	Humana i murina	Humoral i cel.lular
GAD67	Cèl.lules β (principalment), α , δ i PP, cèl.lules neuronals	Síntesi de GABA	Murina	Humoral i cel.lular
GAD65	Cèl.lules β (principalment), α , δ i PP, cèl.lules neuronals	Síntesi de GABA	Humana i murina	Humoral i cel.lular
IA-2	Cèl.lules neuroendocrines	Senyalització	Humana i murina	Humoral i cel.lular
IA-2β	Cèl.lules neuroendocrines	Senyalització	Humana i murina	Humoral i cel.lular
IGRP	Cèl.lules β	Metabolisme de la glucosa	Humana i murina	Humoral i cel.lular
Antigen ICA69	Illots (preferencialment cèl.lules β), cèl.lules neuronals	Transport de grànuls secretors d'insulina	Humana i murina	Humoral i cel.lular
carboxipeptidasa H	Cèl.lules neuroendocrines, present també en d'altres òrgans	Secreció d'insulina	Humana i murina	Humoral i cel.lular
ZnT8	Illot (alta especificitat de cèl.lules β)	Transport de zinc	Humana	Humoral
GM2-1	Cèl.lules neuroendocrines	Gangliòsid	Humana i murina	Humoral
Periferina	Cèl.lules neuroendocrines	Filament intermedi neuroendocrí	Murina	Humoral i cel.lular
REG1A	Illots pancreàtics, cèl.lules acinars	Proliferació cel.lular	Humana	Humoral
REG3A	Illots pancreàtics, cèl.lules acinars	Proliferació cel.lular; lectina bactericida	Murina	Cel.lular
Reg2	Illot (cèl.lules β principalment)	Factor de proliferació	Murina	Cel.lular
Antigen 38 kDa	Cèl.lules β		Humana	Humoral i cel.lular
GFAP	Cèl.lules neuronals	Filament intermedi neuroendocrí	Humana i murina	Humoral i cel.lular
S100β	Cèl.lules neuronals, cèl.lules β	Proteïna d'unió a calci relacionada amb diferents processos cel.lulars	Humana i murina	Humoral i cel.lular
HSP60	Ubíqua	Resposta a estrès cel.lular	Humana i murina	Humoral i cel.lular
HSP70	Ubíqua	Resposta a estrès cel.lular	Humana	Humoral i cel.lular

4.3. AUTOANTICOSSOS

La presència d'anticossos contra autoantígens (autoanticossos) és característica de les malalties autoimmunitàries. En la DT1 es detecten autoanticossos contra antígens insulars tant en pacients com en models animals. Els primers autoanticossos descrits en la DT1 humana van ser els ICA, que reconeixen diversos autoantígens citoplasmàtics presents en les cèl.lules endocrines dels illots [98]. Aquests es detecten en el 70-80% de pacients amb DT1 [99]. Els autoanticossos anti-insulina (IAA) són els primers en aparèixer, i la seva prevalença és inversament proporcional a l'edat d'inici clínic [100]. També es troben en ratolins NOD diabètics i pre-diabètics. Els autoanticossos anti-GAD (GADA) són un bon marcador d'autoimmunitat contra els illots en adults, amb una prevalença del 84% [100]. GAD o descarboxilasa de l'àcid glutàmic s'expressa també en altres cèl.lules dels illots i teixits neuroendocrins. Existeixen dues formes de GAD: GAD65 (majoritària en illots humans) i GAD67 (majoritària en illots murins, tot i que s'expressa dèbilment). Recentment s'ha observat que els individus sans també tenen GADA però aquests estan emmascarats per anticossos anti-idiotip. En canvi, en els pacients amb DT1 no es detecten anticossos anti-idiotip específics d'epítops de GAD65 associats a la DT1 [101]. La proteïna tirosina fosfatasa IA-2 és una proteïna de membrana dels grànuls secretors de les

cèl.lules neuroendocrines. Els autoanticossos contra IA-2 (IA-2A) tenen una prevalença del 70% en pacients amb DT1 [100]. Més recentment s'han identificat també autoanticossos contra el transportador de zinc ZnT8 en el 60-80% de pacients amb DT1 [102].

Els autoanticossos contra antígens neuroendocrins dels illots són predictius del risc de DT1. Aquest risc augmenta amb el nombre d'autoanticossos detectats en sèrum, sent fins el 60-100% en individus amb 3 o més autoanticossos [103]. Normalment, els familiars de pacients que també tenen autoanticossos en sèrum presenten positivitat per un sol autoanticòs. En la DT1 humana els autoanticossos es consideren marcadors de la destrucció de les cèl.lules β i no un mecanisme efector d'aquest dany. Fins al moment, a falta de millors marcadors, la combinació dels haplotips d'HLA de susceptibilitat amb els autoanticossos en sèrum són els paràmetres amb més capacitat predictiva del risc de desenvolupar DT1.

4.4. LIMFÒCITS T

La DT1 és una malaltia mediada per limfòcits T, considerats els principals efectors de l'autoimmunitat contra la cèl.lula β . S'han detectat limfòcits $CD4^+$ i $CD8^+$ infiltrant els illots en pacients amb DT1 i en models experimentals de la malaltia. En la DT1 humana s'han descrit 150 epítops reconeguts per limfòcits T $CD4^+$ d'autoantígens com GAD65, proteïna de xoc tèrmic (HSP) 60, HSP70, IA-2, ICA69 i IGRP, a més de 20 epítops reconeguts per limfòcits T $CD8^+$ pertanyents a GAD65, IA-2, IAPP, IGRP i insulina [104]. A més, s'ha demostrat el reconeixement d'insulina –candidat a autoantigen primari– per part de limfòcits T provinents d'un gangli pancreàtic d'un pacient diabètic amb l'haplotip de susceptibilitat $DR4^+$ [105]. Els limfòcits T específics per autoantígens insulars es poden detectar també en sang perifèrica. Per exemple, s'han detectat en perifèria limfòcits T $CD8^+$ específics per insulina, amb capacitat citolítica *in vitro*. La seva presència correlaciona amb la recurrència d'autoimmunitat després del transplantament d'illots. Això demostra el paper patogènic dels limfòcits T $CD8^+$ en la destrucció de les cèl.lules β [106]. Actualment s'estan dissenyant assaigs de detecció de limfòcits T autoreactius en perifèria, alguns dels quals discriminen entre pacients i controls amb índexs alts de sensibilitat i especificitat [107, 108].

4.5. PRESENTACIÓ ANTIGÈNICA

Existeix una forta associació entre certs haplotips d'HLA i la DT1. Aquest fet subratlla la importància de la presentació antigènica en l'autoimmunitat contra la cèl.lula β . Als illots de pacients amb DT1 s'han detectat APCs (cèl.lules dendrítiques i macròfags) produint citocines proinflamàtores [109]. No se sap on es produeix l'activació inicial dels limfòcits T autoreactius, però la hipòtesi més acceptada és que s'activen als nòduls limfàtics regionals [110]. Les APCs presents als illots capturen i processen autoantígens insulars, migren als nòduls pancreàtics i els presenten als limfòcits T $CD4^+$ i T $CD8^+$. D'aquesta manera s'activen els limfòcits autoreactius contra antígens insulars que han escapat dels mecanismes de tolerància. Els limfòcits T autoreactius es reactivarien als illots pancreàtics al reconèixer els antígens de les cèl.lules β

presentats per aquestes o per APCs intraillot, causant un efecte citotòxic contra les cèl.lules β . Alternativament s'ha proposat que la presentació antigènica i l'activació dels limfòcits T autoreactius podria tenir lloc al mateix òrgan diana, ja que en certes condicions les cèl.lules β poden expressar HLA de classe II de manera inapropiada [111]. A més, als illots pancreàtics de pacients amb DT1 hi ha un augment d'expressió d'HLA de classe I [112] i del transportador de pèptids de la via de classe I TAP-1 (transportador associat amb processament d'antígens 1) [113], que podrien promoure la destrucció β a través de la presentació d'autoantígens de les cèl.lules productores d'insulina.

4.6. INFLAMACIÓ I IMMUNITAT INNATA

El sistema immunitari genera tolerància enfront a elements no perillosos i resposta contra elements perillosos [114], com per exemple els patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) i els patrons moleculars associats a perill (DAMPs). Alguns dels elements considerats "perillosos" són del propi organisme, com les proteïnes de xoc tèrmic, RNA/DNA autòleg, molècules proinflamatòries o elements de cèl.lules mortes que són alliberats a l'exterior. Els PAMPs i DAMPs són reconeguts per lectines de tipus C, receptors tipus NOD (NLRs) i TLRs. Alguns TLRs s'expressen en illots humans [115] i en models animals de DT1 s'ha observat que poden promoure la resposta autoimmunitària [116].

Les citocines i quimiocines proinflamatòries també contribueixen a la insulinitis i a la DT1 tant en pacients com en models animals. Algunes d'elles, com $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\gamma$ i $IL-6$ s'han detectat en pàncrees de pacients amb DT1 [46, 47, 109, 117]. A més, a través d'assaigs *in vitro* s'han descrit: un efecte sinèrgic d' $IFN\gamma$ amb $TNF\alpha$ o bé $IFN\gamma$ amb limfotoxina en la inducció de MHC de classe II en cèl.lules insulars; un efecte d' $IL-1\beta$ o $IFN\gamma$ en la secreció $CXCL10$, $CCL2$, i $IL-15$ en cèl.lules dels illots [118], quimiocines que participen en la quimiotaxi/activació de limfòcits T, monòcits i cèl.lules NK. Les dades del paper de les quimiocines en la DT1 provenen d'assaigs *in vitro*, dades de perifèria i de models experimentals. En el ratolí NOD s'ha constatat el paper diabetogènic de $CCL2$, $CCL3$ i $CXCL10$ entre d'altres. En pacients amb DT1 encara no s'han descrit quines són les quimiocines que participen en la formació de la insulinitis.

Una de les subpoblacions efectores de la resposta innata són les cèl.lules citocides naturals (*natural killer*, NK). Les cèl.lules NK tenen capacitat citotòxica i són productores de citocines, principalment $IFN\gamma$. En les malalties autoimmunitàries se'ls atribueix tant funcions patogèniques com reguladores, ja que per exemple s'han detectat cèl.lules NK amb fenotip activat en articulacions de pacients amb artritis reumatoide (RA) però en canvi s'han associat amb períodes de remissió en l'esclerosi múltiple (MS) [119]. En pacients amb DT1 s'han detectat alteracions en les cèl.lules NK de sang perifèrica, com una lleugera disminució en nombre a l'inici de la malaltia i una menor expressió del receptor activador $NKG2D$ [120]. A més, s'han observat formant part de la insulinitis de tres pacients diabètics amb indicis d'infecció

vírica als illots [63], però no en d'altres estudis amb cohorts més grans de pacients [121]. El seu paper en la DT1 està encara per determinar, però dades de models experimentals *in vivo* relacionen la presència de NK en pàncrees amb una insulitis de tipus agressiu i amb la manca de factors immunoreguladors, tal com es comenta en l'apartat 5.2.1.

4.7. MECANISMES DE CITOTOXICITAT DE LES CÈL·LULES β

S'han proposat diversos mecanismes efectors de la destrucció de les cèl·lules productores d'insulina. Alguns d'ells són dependents del contacte directe entre les cèl·lules T efectores i la cèl·lula β , com la unió de Fas-FasL i TRAIL amb els seus receptors, activant l'apoptosi per la via de les caspases mitjançant dominis de mort cel·lular dels receptors [122]. També es produeix citotoxicitat a través de l'alliberació de grànuls de les CTLs, que contenen perforina i granzims A i B. Alguns mediadors solubles presents en la insulitis són capaços d'induir l'apoptosi de les cèl·lules productores d'insulina. És el cas de citocines, com TNF- α , IL-1 β o IFN- γ , òxid nítric i altres espècies reactives d'oxigen. Aquests mediadors activen l'apoptosi β mitjançant la inducció dels factors de transcripció NF κ B (factor nuclear κ B) i STAT1 (transductor de senyals i activador de la transcripció 1) i la resposta d'estrès del reticle endoplasmàtic [123].

4.8. ALTERACIONS EN LA TOLERÀNCIA CENTRAL

El sistema immunitari elimina els limfòcits potencialment autoreactius mitjançant mecanismes de tolerància. Existeixen dos processos principals de tolerància. Un d'ells és la tolerància central, que té lloc als òrgans limfoides primaris (timus, medul·la òssia) durant la maduració dels limfòcits T i B, respectivament. Els individus sans també tenen limfòcits autoreactius en perifèria, però existeixen un control perquè els limfòcits autoreactius que arribin a perifèria no s'activen. Aquest control és exercit pels mecanismes de la tolerància perifèrica, que tenen lloc en òrgans limfoides secundaris i òrgans no limfoides. Errades en els mecanismes de tolerància central i/o perifèrica contribueixen decisivament al desenvolupament de l'autoimmunitat.

Durant la maduració dels limfòcits T al timus es donen dos processos: la selecció positiva dels timòcits que reconeixen un HLA propi unit a antígen i la selecció negativa dels timòcits que reconeixen HLA-antígen amb alta afinitat. Aquests tenen lloc respectivament al córtex i a la medul·la del timus. Les cèl·lules epitelials medul·lars tímiques (mTECs) expressen petites quantitats d'antígens propis d'altres òrgans [124], eliminant-se durant la selecció negativa els timòcits que reconeixen aquests antígens amb alta afinitat abans de ser alliberats a perifèria. El factor de transcripció Aire (*autoimmune regulator*) regula l'expressió ectòpica d'alguns antígens tissulars a les mTECs, entre ells la insulina. La presència de l'al·lel protector o predisposant del polimorfisme de la regió VNTR més enllà de 5' del promotor de la insulina (*IDDM2*) correlaciona amb el nivell d'expressió d'insulina al timus [27, 125].

La tolerància central dels limfòcits B té lloc a la medulla òssia. Els limfòcits B immadurs que interaccionen amb proteïnes pròpies presents a la medulla a través de la IgM de la seva superfície són eliminats mitjançant apoptosi o bé resten en un estat d'anèrgia. En limfòcits autoreactius, mitjançant l'edició del receptor es pot modificar el reordenament del TCR o de les Igs i per tant la seva especificitat. Recentment s'han descrit defectes en l'edició del receptor dels limfòcits B en pacients amb DT1 [126].

4.9. ALTERACIONS EN LA TOLERÀNCIA PERIFÈRICA

Per controlar l'expansió i l'activació dels limfòcits T autoreactius, existeixen mecanismes de tolerància perifèrica com l'anèrgia, la selecció i la immunoregulació. Aquest darrer està mediat sobretot per les cèl·lules T reguladores (Tregs), cèl·lules amb funció supressora de la resposta immunitària que actuen tant als òrgans limfoides secundaris com al teixit diana. Hi ha dos tipus de cèl·lules T CD4⁺ reguladores: les Tregs naturals (nTregs), que es generen al timus i expressen constitutivament CD25 i el factor de transcripció FoxP3, i les que són induïbles a partir de limfòcits T *naïve* mitjançant citocines reguladores com TGF- β i IL-10. Diversos grups han estudiat les Tregs en pacients amb DT1, i tot i que no hi ha un total consens, en alguns casos s'han detectat alteracions en la seva capacitat supressora [127].

Les cèl·lules estromals dels òrgans limfoides secundaris expressen antígens tissulars perifèrics (PTAs) –incloent antígens d'illot- i s'hi produeix una selecció clonal de limfòcits autoreactius en perifèria. Recentment s'ha demostrat que l'expressió de PTAs a nòduls limfoides depèn del factor de transcripció Deaf1. En pacients amb DT1 i ratolins NOD amb insulinitis destructiva augmenta l'expressió d'una variant de *splicing* de Deaf1 que reté aquest factor de transcripció al citoplasma, inhibint l'expressió d'antígens insulars al nòdul pancreàtic [128].

4.10. AUTOIMMUNITAT A L'ÒRGAN DIANA EN LA DT1 HUMANA

La caracterització de la resposta autoimmunitària a l'òrgan diana de la DT1 és difícil degut a la manca d'accés al pàncrees en pacients en les fases inicials de les lesions. Hi ha pocs casos on s'hagin obtingut mostres de pàncrees de pacients diabètics, sobretot a l'inici clínic de la malaltia, ja que la DT1 no sol ser una causa de mortalitat directa. La fase pre-diabètica no sol ser detectada i probablement és la més interessant des del punt de vista immunològic. Les biòpsies pancreàtiques no es practiquen de forma habitual degut al risc de pancreatitis, amb l'excepció del Japó [129]. No obstant, alguns grups han realitzat estudis histològics de les escasses mostres que s'han obtingut, descrivint algunes manifestacions de la resposta autoimmunitària als illots pancreàtics.

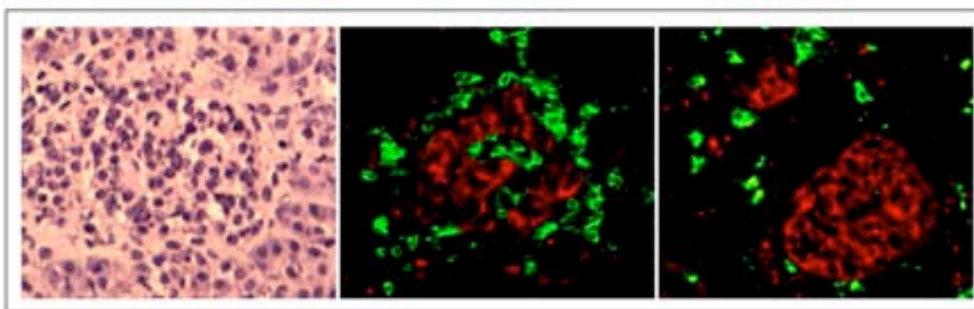


Figura 2. Insulinitis humana. Imatges corresponents a illots pancreàtics d'un pacient amb DT1 a l'inici clínic de la malaltia. La imatge de l'esquerra correspon a una secció pancreàtica tenyida amb hematoxilina i eosina (H&E), i s'hi observa un illot amb insulinitis. A les imatges corresponents a tincions immunohistològiques, s'observen illots marcats amb GAD (vermell) amb presència de limfòcits T (CD3, verd, imatge central) i macròfags (CD68, verd, imatge de la dreta) a la insulinitis.

En la majoria dels casos estudiats s'ha observat una lleugera infiltració dels illots formada per cèl.lules mononuclears, majoritàriament limfòcits T i macròfags [46, 112, 121, 129-131], com s'exemplifica a la **Figura 2**. La majoria dels limfòcits T en la insulinitis humana són CD8⁺, però també s'hi han detectat limfòcits TDC4⁺, limfòcits B i cèl.lules dendrítiques, tot i que en menor quantitat. S'observa una pèrdua d'expressió d'autoantígens com GAD i insulina als illots [46, 129]. Les cèl.lules endocrines sobreexpressen HLA de classe I [46, 112, 129-131], i ocasionalment poden expressar HLA de classe II de forma ectòpica [46, 112, 130, 132]. Als illots pancreàtics i endotelis s'ha observat una sobreexpressió de molècules d'adhesió (ICAM-1, VLA) [46, 130, 131]. També s'ha detectat una expressió de Fas a les cèl.lules endocrines i de lligand de Fas als leucòcits infiltrants [133]. Les principals manifestacions autoimmunitàries descrites en pàncrees de pacients diabètics es resumeixen a la **Taula 3**.

Taula 3. Resposta autoimmunitària en pàncrees de pacients amb DT1

ALTERACIÓ	LOCALITZACIÓ
Insulinitis amb predominància de limfòcits TCD8 ⁺ [46, 112, 121, 129-131]	Illots i perifèria insular
Insulinitis amb predominància de cèl.lules NK [63]	Illots positius per la proteïna enteroviral vp1
Sobreexpressió d'HLA de classe I [46, 112, 129-131]	Illots
Marcatge positiu per la proteïna enteroviral vp1 [134]	Cèl.lules β
Expressió ectòpica d'HLA de classe II [46, 112, 130, 132]	Illots, cèl.lules ductals
Sobreexpressió de molècules d'adhesió (ICAM1, VLA) [46, 130, 131]	Illots i endotelis
Sobreexpressió de TAP-1 [113]	Illots
Dipòsits d'anticossos IgG fixadors de complement [46, 112]	Illots i perifèria insular
Expressió de CD80 i CD86 [135]	Limfòcits T infiltrants
Pèrdua de l'expressió d'autoantígens (GAD, insulina) [46, 129]	Cèl.lules β
Presència de perforina (mRNA) [46]	Pàncrees
Expressió de Fas [133]	Cèl.lules α i β
Expressió de lligand de Fas [133]	Leucòcits infiltrants
Expressió d'IFN-γ [117], IFN-α, IFN-β(mRNA) i IL-6(mRNA) [46, 47]	Pàncrees, limfòcits (IFN-γ)
Expressió de TNF-α i IL-1β [109]	Macròfags i cèl.lules dendrítiques infiltrants del pàncrees

5. MODELS EXPERIMENTALS DE DT1

Una alternativa al difícil accés al teixit diana de la DT1 humana és l'estudi de models experimentals. A més, la facilitat de manipulació genètica fa que els models experimentals de DT1 estiguin contribuïnt a la detecció de nous factors genètics predisponents. També permeten comprovar l'efecte d'agents ambientals en la DT1 i assajar possibles noves teràpies. Tots aquests factors han fet que, malgrat les seves limitacions [136], s'hagi extès l'ús de models animals per investigar en el camp de la DT1, principalment de ratolí (*Mus musculus*) i rata (*Rattus norvegicus*) [137]. En els principals models experimentals utilitzats la DT1 s'indueix quirúrgicament, farmacològicament o mitjançant virus. També s'utilitzen models espontanis i models modificats genèticament.

5.1 MODELS INDUÏTS

5.1.1. Models induïts quirúrgicament

La DT1 es pot induir quirúrgicament mitjançant una pancreatectomia total o parcial, causant una pèrdua de cèl.lules β i insulinodependència, tot i que aleshores la diabetis no és autoimmunitària. Els models de pancreatectomia total s'utilitzen per induir diabetis i posteriorment realitzar estudis de transplantament. Els models de pancreatectomia parcial s'han utilitzat en estudis de regeneració, després d'una reducció de massa cel.lular β es poden donar processos de regeneració insular [138].

5.1.2. Models induïts farmacològicament

En d'altres models experimentals de DT1 s'indueix la malaltia mitjançant l'administració d'un fàrmac que causa un efecte deleteri en les cèl.lules β (com l'aloxà o l'estreptozotocina) o un efecte immunomodulador (com la ciclofosfamida).

L'aloxà (2,4,5,6-Tetraoxipirimidina) és un fàrmac derivat de pirimidines que utilitza el transportador de glucosa GLUT-2 per entrar a les cèl.lules β , on s'acumula. El seu metabolisme genera espècies reactives d'oxigen que causen una necrosi de les cèl.lules β i una diabetis insulinodependent, però no autoimmunitària [139]. Al ser també és un inhibidor de l'enzim glucoquinasa –sensor de glucosa a les cèl.lules β - inhibeix la secreció d'insulina en les fases de dany inicials.

L'estreptozotocina o STZ (2-Deoxi-2-[(metilnitrosoamino)carbonil]amino)-D-glucopiranos) és un anàleg de la nitrosurea. És una toxina antimicrobiana produïda per bacteris del gènere *Streptomyces*, utilitzada també com a fàrmac quimioteràpic. La seva via d'entrada a les cèl.lules β és, com en el cas de l'aloxà, el transportador GLUT-2. La STZ té un efecte alquilant del DNA, que provoca la necrosi de les cèl.lules β [139]. Existeixen dues variants de la diabetis induïda per STZ: el model de dosi única, que causa una ràpida necrosi de les cèl.lules β , i el model de múltiples dosis subdiabetogèniques, que causa una hiperglicèmia

d'aparició més lenta, formació d'insulitis i diabetis [140], en certa manera comparable a la DT1 autoimmunitària.

La ciclofosfamida (Cy) [56] és un agent amb propietats quimioterapèutiques i immunomoduladores. Mitjançant 1-2 dosis accelera i promou la DT1 en la soca susceptible NOD, tant en mascles com en femelles [141]. Un altre model força utilitzat és la inducció de DT1 amb Cy en el ratolí NOD transgènic pel TCR BDC2.5 –provinent d'un clon T CD4⁺ diabetogènic-. En aquest cas la diabetis s'indueix en només 5-7 dies [142]. Es creu que el mecanisme d'acció de la Cy en la insulitis experimental és l'alteració d'algun mecanisme supressor preexistent [142, 143]. Aquest model induït presenta limitacions a l'hora d'establir comparacions amb la DT1 en pacients, ja que la Cy té un efecte tòxic sobre els limfòcits B [144].

5.1.3. Models induïts a través de virus

Alguns virus poden induir DT1 en models animals. Per exemple, el virus de l'encefalomiocarditis i el mengovirus poden causar DT1 en models murins mitjançant destrucció citolítica directa de les cèl.lules β [49]. La infecció del model de rata DR-BB (resistent a la diabetis) amb el virus Kilham causa una diabetis autoimmunitària. S'ha proposat que el virus fa augmentar la síntesi de citocines proinflamatòries en macròfags, promou una resposta Th1 en limfòcits T CD4⁺ i activa la resposta citolítica dels limfòcits T CD8⁺.

5.2. MODELS ESPONTANIS

Al llarg del temps, durant la generació de diversos models animals van sorgir ocasionalment individus que van desenvolupar hiperglicèmia i van mostrar susceptibilitat a la diabetis. A partir d'aquests s'han establert soques experimentals que desenvolupen DT1 de forma espontània.

5.2.1. Ratolí NOD

La soca de ratolins NOD és el model animal de DT1 més utilitzat, ja que desenvolupa una diabetis autoimmunitària amb característiques semblants a la DT1 humana. Aquesta soca va ser originada a partir d'una línia de ratolins susceptibles a les cataractes [24]. En els ratolins NOD es forma una insulitis molt més abundant que la humana i formada per limfòcits T CD4⁺ (majoritàriament), limfòcits T CD8⁺, macròfags, cèl.lules NK i cèl.lules dendrítiques. La insulitis apareix a partir de les tres setmanes d'edat i augmenta progressivament fins l'inici clínic de la diabetis, que es dona a partir de les 12-14 setmanes. La incidència al Centre d'Experimentació Animal Germans Trias i Pujol és del 70% en femelles i 30% en mascles en condicions SPF. La DT1, autoimmunitària, és transferible a través de limfòcits de ratolins NOD diabètics, accelerant la malaltia en ratolins NOD pre-diabètics i trencant la tolerància en NOD immunodeficients. La soca NOD és susceptible a desenvolupar altres manifestacions autoimmunitàries a més de la

DT1 com sialitis, tiroiditis, prostatitis, i és un model de lupus eritematós sistèmic (LES) induïble amb extractes de *Mycobacterium* [145].

La DT1 en el model murí NOD és poligènica. El factor genètic més rellevant es troba al *locus* del MHC de classe II (*Idd1*). La molècula I-A^{g7} determina el seu haplotip característic H-2^{g7}. Aquesta conté un residu valina a la posició 57 de la cadena β, a diferència de l'aspàrtic que presenten altres soques no diabetogèniques en la mateixa posició. Aquesta peculiaritat altera el repertori peptídic presentat per la I-A^{g7}. A més, els ratolins NOD tenen una deleció a la regió promotora del *locus* Eα i no expressen la molècula I-E. La reversió d'aquests dos defectes mitjançant transgènesi protegeix els ratolins NOD de la DT1 [146]. A banda del MHC, també s'han descrit altres *loci* de susceptibilitat a la malaltia (*Idd1-Idd27*) [147], (T1Dbase, www.t1dbase.org).

La DT1 en el ratolí NOD està mediada principalment per limfòcits T, que actuen com a cèl.lules efectores de l'autoimmunitat contra les cèl.lules β. Els limfòcits T diabetogènics reconeixen epítops d'antígens insulars, com per exemple (pro)insulina, GAD, IGRP, IA-2/IA-2β i Hsp60 [104]. En el ratolí NOD, la destrucció autoimmunitària no és exclusiva les cèl.lules β: durant la diabetogènesi també es destrueix la capa peri-insular de cèl.lules de Schwann [96]. En aquest model s'ha descrit una resposta humoral i cel.lular contra elements del sistema nerviós [96, 148, 149]. Experiments de transferència de la malaltia a ratolins NOD.*Scid* demostren que tant els limfòcits T CD4⁺ i T CD8⁺ per sí sols poden transferir la malaltia [145] però que la seva col.laboració n'augmenta el potencial diabetogènic [150]. Els limfòcits TCD8⁺ actuen com a limfòcits citotòxics contra les cèl.lules β, i són capaços de transferir la DT1 a models immunodeficients [151]. S'ha hipotetitzat que el dany inicial causat per limfòcits TCD8⁺ augmentaria l'exposició d'antígens β, contribuint a amplificar la resposta dels limfòcits T CD4⁺. Aquests darrers també tenen capacitat citolítica contra cèl.lules β, considerant-se efectors els limfòcits T CD4⁺ de tipus Th1, productors d'IFN_γ i TNFα [152]. Els principals mecanismes de citotoxicitat contra les cèl.lules β en els ratolins NOD són dependents de Fas i perforina. Les citocines proinflamàtores de tipus Th1 i espècies reactives d'oxigen també poden causar citotoxicitat o predisposar les cèl.lules β a la mort per Fas o perforina [153]. En la DT1 clàssicament s'ha considerat que hi ha un predomini de resposta de tipus Th1, i que una desviació cap a respostes de tipus Th2 té un efecte protector [152]. El paper dels limfòcits T CD4⁺ de tipus Th17 (productors de la citocina proinflamatòria IL-17) en la DT1 encara no es coneix. Dades recents indiquen que la inhibició de la resposta Th17 té un efecte protector de la DT1 [154].

L'activació inicial de les cèl.lules T diabetogèniques en el ratolí NOD té lloc al nòdul limfàtic pancreàtic (pLN) cap a les 3 setmanes d'edat [155]. S'inicia després un fenomen d'apoptosi de cèl.lules β que es dona als 12 dies a totes les soques murines de forma fisiològica [156]. Aquest fenomen promou la captació d'antígens de cèl.lules β per part d'APCs (principalment cèl.lules dendrítiques) dels illots, que els transporten al pLN, on els presenten a

les cèl·lules T autoreactives, activant-les [157]. Paral·lelament, les cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDCs) presents al pLN augmenten la producció d'IFN- α en resposta a l'activació de TLRs per lligands de cèl·lules β apoptòtiques. Aquest augment d'IFN- α al pLN contribueix a l'activació de les cèl·lules T CD4⁺ a l'inici de la insulitis [158]. Els macròfags apareixen en les primeres fases de la insulitis, juntament amb altres APCs. Una de les seves funcions més importants és la fagocitosis de cèl·lules apoptòtiques. Els macròfags dels ratolins NOD tenen una menor capacitat de netejar debrís de cèl·lules β apoptòtiques, fet que promou un microambient inflamatori i correlaciona amb l'inici de la DT1 [159].

Els limfòcits B també participen en la DT1 en el ratolí NOD. La seva importància es posa de manifest en el model NOD.Ig μ^{null} , defectiu pel gen de la cadena μ d'immunoglobulines i resistent a la DT1 [160]. Els ratolins NOD diabètics i pre-diabètics presenten en sèrum autoanticossos contra antígens comuns amb la DT1 humana, com insulina, GAD65, i IA-2. Curiosament, la majoria de limfòcits B infiltrants d'illot dels ratolins NOD reconeixen antígens propis del sistema nerviós [148]. En la DT1 no s'ha pogut demostrar que els autoanticossos tinguin un paper patogènic. L'única excepció és la transmissió d'autoanticossos materns, que sí s'ha observat que la seva eliminació protegeix de la DT1 als ratolins NOD [161]. Una de les funcions que se'ls atribueix és la de cèl·lules presentadores d'antigen, contribuint a l'expansió dels limfòcits T CD4⁺ autoreactius [160, 162].

Pel que fa a la presència de cèl·lules NK al pàncrees, aquesta correlaciona amb la formació d'un tipus d'insulitis més agressiva [163, 164]. El ratolí NOD presenta deficiències numèriques i funcionals de cèl·lules NK [165]. En aquest model, les cèl·lules NK produeixen menor quantitat del receptor activador NKG2D, ja que alhora expressen lligands de NKG2D RAE-1 i H-60, que el modulen negativament [166].

El ratolí NOD té defectes en la tolerància central, per exemple en l'apoptosi dels timòcits, afectant a la seva selecció negativa [167]. La unió dèbil pèptid-MHC en el cas de pèptids presentats per I-A^{g7} també altera la selecció negativa [168]. A més, també s'han detectat alteracions en la tolerància perifèrica en aquest model, com per exemple defectes en la coestimulació, segon senyal necessari per l'activació limfocitària: el model NOD presenta un polimorfisme en la molècula coestimuladora inhibidora CTLA-4 (*Idd5.1*), que genera menor quantitat de la isoforma de CTLA-4 independent de lligand (liCTLA-4) sense el domini d'unió a B7 i afecta al llindar d'activació de les cèl·lules T memòria [169]. A més, en les APCs de ratolí NOD s'ha observat un biaix en la secreció de citocines cap a un tipus de resposta Th1, associada a la malaltia [169]. En quant al control mitjançant Tregs, alguns estudis han descrit un dèficit d'aquestes cèl·lules en el model NOD, tot i que d'altres treballs no ho confirmen [145]. Sí s'ha observat que al llarg de la progressió de la DT1 hi ha una pèrdua de funcionalitat de les Tregs intrainsulars, a causa d'un dèficit de producció d'IL-2 (*Idd3*) de les cèl·lules T efectores dels illots [170]. Les cèl·lules NKT, que reconeixen glicolípid restringits per CD1, també tenen una funció reguladora: el tractament amb α -GalCer (agonista de cèl·lules NKT),

redueix la incidència de DT1 en el model NOD [171]. Els ratolins NOD tenen un dèficit de cèl·lules NKT, sobretot al timus, i aquestes mostren menor capacitat de producció d'IL-4 [165]. Existeix un subtipus de limfòcits T CD8⁺ amb un TCR que reconeix el complex MHC-pèptid amb baixa avidesa. Aquests limfòcits T CD8⁺ de baixa avidesa i fenotip memòria tenen també un efecte regulador [172].

El microambient dels illots pancreàtics en els ratolins NOD conté mediadors proinflamatoris que contribueixen a la progressió de la DT1. S'han detectat per exemple quimiocines pro-inflamatòries com CCL2, CCL3 i CXCL10, entre d'altres, que contribueixen al reclutament leucocitari [173]. S'ha observat que la inducció de la seva expressió als illots promou la DT1 [174, 175].

Els principals mecanismes que desencadenen la resposta autoimmunitària en el model experimental NOD es resumeixen a la **Figura 3**:

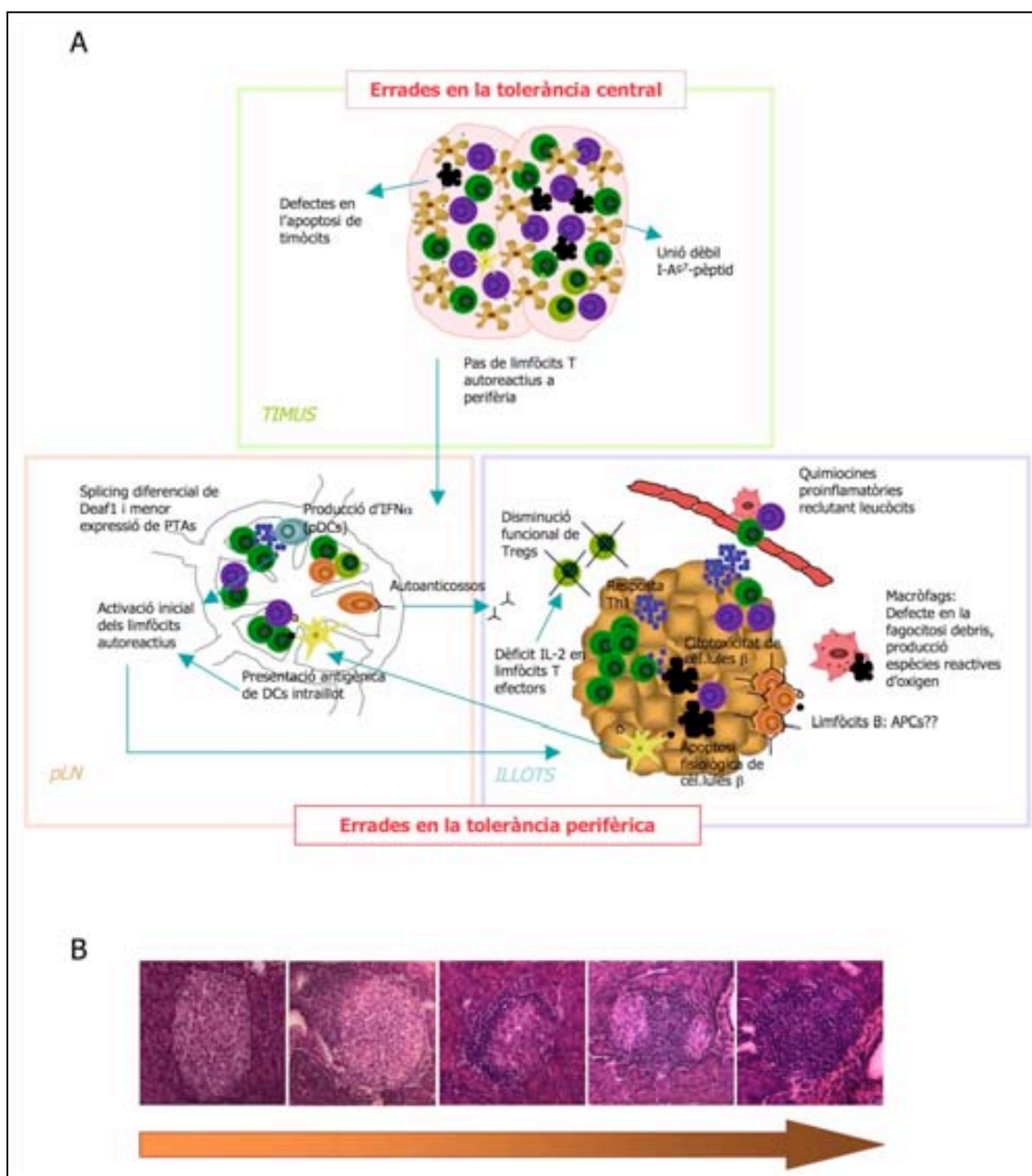


Figura 3: A Resposta autoimmunitària contra les cèl·lules β en els ratolins NOD. Principals alteracions de la tolerància central i perifèrica i mecanismes efectors i reguladors a l'òrgan diana. **B. Progressió de la insulinitis en el ratolí NOD.** Imatges de microscopia de seccions pancreàtiques de ratolins NOD tenyides amb H/E on s'observen illots amb diferents graus d'infiltració leucocitària o insulinitis. D'esquerra a dreta: illot normal, illot amb peri-insulinitis (en un extrem de l'illot), illot amb insulinitis lleu (<25% de l'illot), illot amb insulinitis moderada (25-75% de l'illot) i illot amb insulinitis severa (>75% de l'illot). Magnificació: 200x.

Com a soques control en l'estudi de la DT1 s'utilitzen les soques NOR (no obès resistant) i NOD.Scid (Scid, immunodeficiència combinada severa), relacionades amb la soca NOD però resistents a la malaltia. La soca NOR és una soca congènica del seu homòleg susceptible NOD, i comparteixen el 88% del fons genètic, incloent l'haplotip H-2^{g7} i alguns altres *loci* de susceptibilitat. La resta del seu genoma, incloent alguns *loci* de resistència, prové de la soca C56BL6/J, resistent a la DT1. El model NOR és totalment resistent a la DT1. Els ratolins NOR són resistents a la insulinitis, només mostren ocasionalment una lleu peri-insulinitis [176]. La

soca NOD.*Scid*, amb fons genètic NOD, presenta una mutació en homozigosi que causa una immunodeficiència severa. El gen responsable de la mutació *scid* en ratolí és *Prkdc*, corresponent a la subunitat catalítica de la proteïna cinasa dependent de DNA, i involucrat en la reparació del DNA. Aquesta mutació causa una alteració en el reordenament del receptor dels limfòcits T (TCR) i de les immunoglobulines, impeding el desenvolupament de limfòcits T i B funcionals. Per tant, els ratolins NOD.*Scid* no desenvolupen DT1 ni insulinitis, excepte si són transferits amb limfòcits de ratolins NOD immunocompetents. El model NOD.*Scid* presenta una freqüència alta de generació espontània de timomes [177].

5.2.2. Rata BioBreeding (DP-BB)

Encara que menys comuns que en ratolí, també s'utilitzen models de rata de DT1, tant espontanis com induïts. La rata BioBreeding susceptible a la diabetis (DP-BB) és un model espontani generat a partir de rates del model Wistar que van desenvolupar espontàniament hiperglicèmia i cetoacidosis. La rata DP-BB desenvolupa diabetis autoimmunitària a partir dels 50-90 dies de vida. Presenta una infiltració leucocitària dels illots pancreàtics, en la que predominen els limfòcits T de tipus Th1 [178]. Genèticament, la rata DP-BB té un haplotip MHC de classe II de predisposició a la diabetis: RT1 B/D^u (*Iddm1*). Un altre locus determinant es troba al gen *Gimap5* (*Iddm2*), responsable a més d'una mutació que causa en aquest model una limfopènia T molt acusada. Recentment s'ha vist que la DT1 és poligènica en aquest model, i se n'han descrit nous *loci* de susceptibilitat (*Iddm25-Iddm36*) [179]. En algunes colònies de rata BB es detecten autanticossos ICA i GADA en sèrum. A més de la limfopènia T, també s'han descrit altres defectes en el sistema immunitari de la rata DP-BB, per exemple en les poblacions de cèl.lules NK i NKT.

5.3. MODELS GENÈTICAMENT MODIFICATS

Les tècniques d'enginyeria genètica actuals permeten generar models experimentals genèticament modificats; per exemple, els models transgènics, en els que s'incorpora un gen exògen al genoma de l'organisme, els models *knockin*, en els que s'introdueix una mutació dirigida en un gen de l'organisme, i els models *knockout*, en els que s'introdueix una mutació que anul·la l'expressió d'un gen a totes les cèl.lules de l'organisme. Aquests models es generen normalment en ratolí, donada la seva facilitat de manipulació i cria, l'elevada taxa de fertilitat i un període de gestació curt. Per poder estudiar alguns aspectes de la DT1 s'han generat models genèticament modificats d'autoantígens, TCRs de clons diabetogènics, molècules de MHC, molècules co-estimuladores, antígens vírics, citocines, etc [145].

5.3.1. Efecte de l'interferó β en la DT1: models experimentals

L'interferó β (IFN β) és una citocina del grup dels IFNs de tipus I amb efectes antivirals, proinflamatoris i immunomoduladors. L'expressió d'IFNs de tipus I -IFN α , IFN β i IFN κ - a les cèl.lules β en models experimentals indueix una diabetis autoimmunitària [180-182].

El nostre grup va generar models murins genèticament modificats per estudiar l'efecte de l'IFN β en la DT1 en ratolins NOD i soques emparentades. Aquests models permeten estudiar indirectament l'associació de les infeccions víriques i la DT1, ja que l'expressió d'IFN β és produït en cèl.lules o teixits a causa d'una infecció. Quan s'expressa transgènicament en models murins, l'IFN β humà promou la destrucció de les cèl.lules β [181]. El ratolí NOD transgènic per IFN β humà ha estat utilitzat en aquest estudi, com a model experimental on la DT1 es dona de forma accelerada i agressiva.

5.3.1.1. Generalitats de l'IFN β

L'IFN β és un IFN de tipus I, grup de citocines antivirals. Els IFNs de tipus I tenen un receptor comú, format per les subunitats IFNAR-1 i IFNAR-2. Aquest, després de la unió al lligand, fosforila cinases de la família Janus (Jak1, Tyk2) que activen transductors de senyals de les famílies STAT i IRF (IFN regulatory factor). STAT1, STAT2 i IRF9 es transloquen al nucli i formen el complex ISGF3 que activa l'expressió de gens amb una regió ISRE (*IFN-stimulated response element*) al seu promotor [183]. L'expressió d'IFN β s'indueix principalment com a resposta a les infeccions, principalment víriques però també causades per bacteris, protozous i helmints i per productes bacterians [184]. A més, l'activació cel.lular a través de TLRs també augmenta la producció d'IFNs de tipus I. L'IFN β [184] participa en la resposta antiviral mitjançant la inducció de l'expressió gènica de la 2',5'-oligoadenilat sintasa, MX1 o proteïna de resistència a *myxovirus 1*, i la PKR o proteïna cinasa dependent de dsRNA. Aquestes proteïnes inhibeixen la replicació viral i activen l'apoptosi de les cèl.lules de l'hoste. A més, modula la resposta immunitària innata i adaptativa: indueix l'expressió de MHC I i citocines, augmenta la citotoxicitat de les cèl.lules NK i la seva capacitat secretora de citocines, promou la resposta de tipus Th1, modula la diferenciació i la funció de macròfags, promou la maduració de DCs, promou l'expansió clonal de cèl.lules T memòria, i juntament amb IL-6 media la diferenciació dels limfòcits B activats a cèl.lules plasmàtiques. L'IFN β també té activitat antiproliferativa i proapoptòtica.

La funció immunomoduladora dels IFNs de tipus I i la hipòtesi vírica de l'autoimmunitat, han fet associar aquestes citocines amb algunes malalties autoimmunitàries [185]. S'ha proposat que els IFNs de tipus I podrien estar implicats en el desencadenament de malalties com el LES, la DT1, la MS (en la que s'utilitza l'IFN β com a tractament, per les seves propietats immunomoduladores), la RA i la miastènia greu. En la DT1, la relació de l'IFN β amb les infeccions víriques i l'activació de la resposta autoimmunitària s'ha suggerit i aquesta citocina s'ha detectat (mRNA) en pàncrees de pacients diabètics [46].

5.3.1.2. Models transgènics d'IFN β

El ratolí transgènic RIP-IFN β expressa IFN β humà a les cèl.lules β , sota el control del promotor de la insulina I de rata (RIP) [186]. L'elecció de l'IFN β humà (unes 1000 vegades menys efectiu que l'IFN β murí en cèl.lules de ratolí) és deguda a que l'expressió d'IFN β murí sota el control de RIP causa un efecte deleteri en la supervivència de la colònia. El model transgènic RIP-IFN β es va generar inicialment en fons genètic C57BL/6JL, fons de resistència a la DT1. Els ratolins de la soca transgènica resultant desenvolupaven peri-insulitis però seguien sent resistents a la DT1. A partir d'aquest model es va introduir el transgèn RIP-IFN β en ratolins de la colònia CD-1 mitjançant retrocreuaments. Aquests animals també mostraven peri-insulitis i un 11% de mascles desenvolupaven DT1. A partir de la colònia CD-1 RIP-IFN β , el nostre grup va generar el ratolí transgènic RIP-IFN β en tres fons genètics: NOD [187], NOR [188] i NOD.Scid [177] (**Figura 4**):

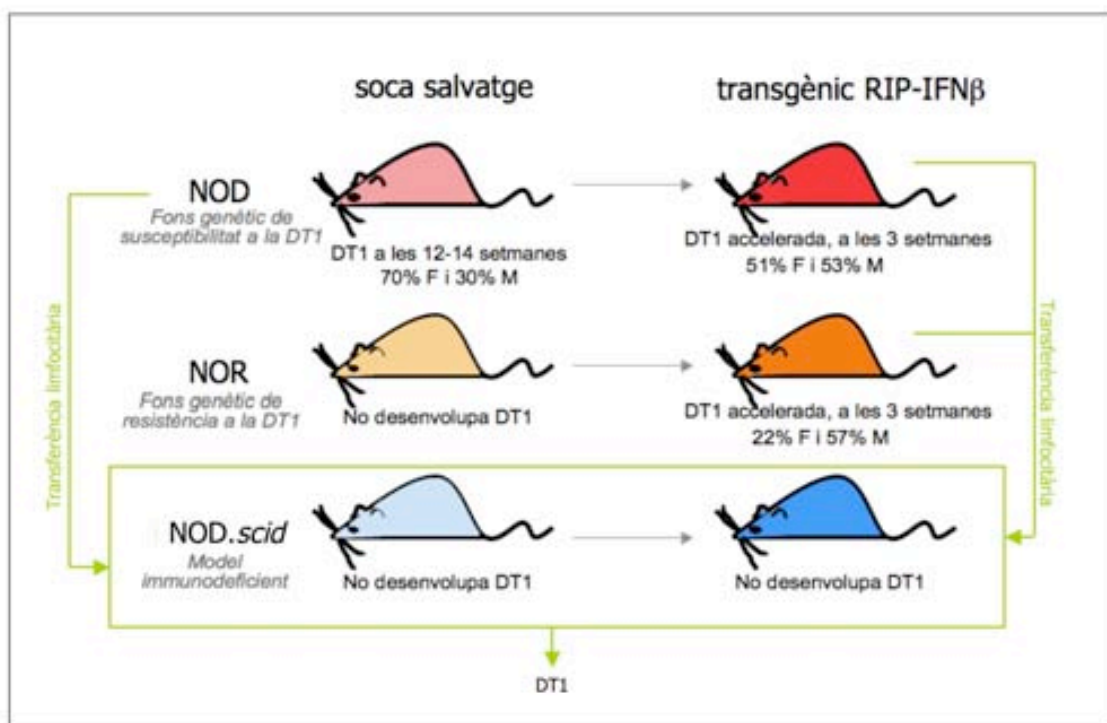


Figura 4. Efecte del transgèn RIP-IFN β en el desencadenament de la DT1 en diferents fons genètics.

A la soca transgènica NOD RIP-IFN β la DT1 apareix a partir de les tres setmanes d'edat, accelerant-se respecte la soca salvatge NOD en la que l'inici de la DT1 es dona a partir de les 12-14 setmanes. Sorprenentment, l'expressió del transgèn RIP-IFN β a la soca resistent NOR trenca la tolerància i desencadena també una DT1 accelerada, amb característiques semblants a la soca NOD RIP-IFN β [181]. La incidència de la malaltia és semblant en mascles i femelles (53% i 51% respectivament), tal com s'observa a la **Figura 5**. El model transgènic NOD.Scid RIP-IFN β , immunodeficient, no desenvolupa insulitis ni diabetis.

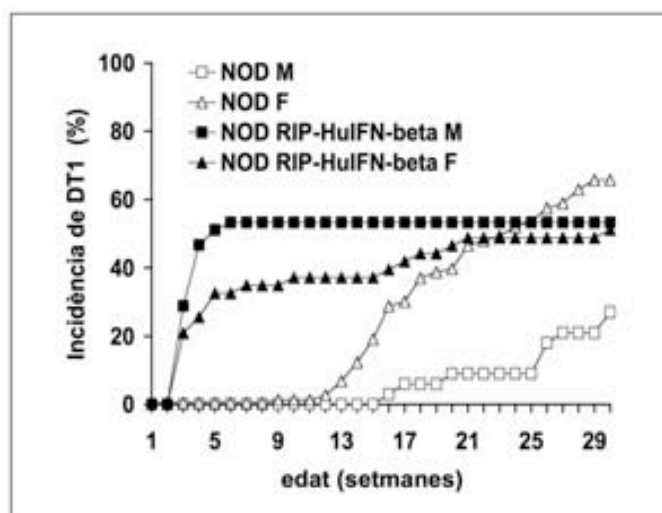


Figura 5. Incidència de DT1 en el model de ratolí NOD transgènic per IFN β . Adaptat de Alba A. et al [181]. La presència d'IFN β a les cèl.lules β pancreàtiques accelera l'inici clínic de la DT1 a les tres setmanes d'edat. La incidència de la malaltia és del 53% en mascles (M) i del 51% en femelles (F).

La diabetis en aquests models és autoimmunitària, com ho demostren la presència d'insulits, la transferència de la malaltia a través de limfòcits i les dades metabòliques [181]. La diabetis accelerada en els models NOD RIP-IFN β i NOR RIP-IFN β va acompanyada d'un augment significatiu de cèl.lules NK al pàncrees. La seva depleció frena la diabetis accelerada en aquests models [164].

6. TRANSCRIPTÒMICA: APLICABILITAT EN LA DT1

6.1. MICROARRAYS D'EXPRESSION GÈNICA: METODOLOGIA I APLICACIONS

La metodologia dels *microarrays* permet quantificar el transcriptoma sencer d'una mostra en un sol experiment [189]. Aquesta tècnica consisteix en la hibridació de RNA o DNA còpia (cRNA o cDNA) d'una mostra marcat amb fluorocroms en un suport sòlid, que conté milers de sondes de DNA. Cada transcrit s'uneix amb la seva sonda complementària i se'n pot quantificar l'abundància en una mostra segons el nivell de fluorescència.

Existeixen diferents tipus de *microarrays* d'expressió gènica:

- Segons el nombre de sondes, s'utilitzen *microarrays* d'alta densitat amb milers de sondes o bé xips restringits a desenes o centenes de gens dissenyats "a la carta" per estudiar una funció o grup de gens determinat.
- Segons el tipus de sonda, podem distingir entre *microarrays* de cDNA i *microarrays* d'oligonucleòtids. En els primers, les sondes són fragments d'un nombre variable de nucleòtids, normalment obtinguts a partir d'una amplificació per PCR. Mitjançant una tècnica robotitzada, cada sonda és col·locada en un punt determinat d'un suport sòlid (normalment de vidre o plàstic). En els *microarrays* d'oligonucleòtids cada gen està

representat per un conjunt d'una desena de sondes de 25 nucleòtids. Aquestes són sintetitzades *in situ* mitjançant fotolitografia damunt d'un suport de silici. Per cada sonda de 25 nucleòtids hi ha una sonda equivalent amb un nucleòtid central erroni, que serveix com a mesura de la unió inespecífica. Un avantatge d'aquest tipus de *microarrays* és que tant els processos de fabricació de l'*array* com els protocols d'hibridació estan molt estandarditzats i això augmenta la reproducibilitat entre experiments.

- Segons els canals de fluorescència que es poden detectar, existeixen *microarrays* d'un sol canal i *microarrays* de més d'un canal -normalment dos però s'han assajat fins a 4 canals [190]-. En els *microarrays* de dos canals, s'hibriden alhora les dues mostres a comparar marcades amb fluorocroms diferents, habitualment cianina 3 (Cy3) i cianina 5 (Cy5). La relació entre les intensitats de fluorescència dels dos fluorocroms indica la quantitat relativa de trànscrips d'una mostra respecte l'altra. Els *microarrays* de més un canal permeten minimitzar costos, ja que es pot analitzar més d'una mostra en un sol experiment. Una limitació és la possible incorporació diferencial dels diferents fluorocroms. En els *microarrays* d'un sol canal, cada mostra s'hibrida en un *array* diferent. Aquest sistema permet realitzar diferents comparacions entre mostres a posteriori, facilita el disseny experimental i la normalització de les dades.

Aquesta metodologia genera milers de dades a cada experiment. Per processar-les s'utilitzen eines de bioestadística i bioinformàtica. Les dades resultants es poden emmagatzemar en bases de dades d'expressió gènica com *Gene Expression Omnibus* (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) o *ArrayExpress* (www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/) per fer-les accessibles a la comunitat científica. També existeixen bases de dades com *SymAtlas* (symatlas.gnf.org/deprecated/) on hi ha dades del grau d'expressió de cada gen en diferents teixits. Altres bases de dades de genòmica recullen informació sobre els diferents gens, com per exemple *Entrez Gene* (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=search&db=gene) i *GeneCards* (www.genecards.org/index.shtml). Mitjançant eines d'anotació funcional es poden analitzar les ontologies dels gens amb expressió diferencial i integrar-les en xarxes i vies de senyalització. Les ontologies més utilitzades són les de *GeneOntology* (www.geneontology.org/) i les assignades mitjançant el programa *Ingenuity Pathway Analysis* o IPA (www.ingenuity.com). A la **Figura 6** es mostra un esquema de l'anàlisi dels perfils d'expressió gènica segons les dades obtingudes mitjançant *microarrays*:

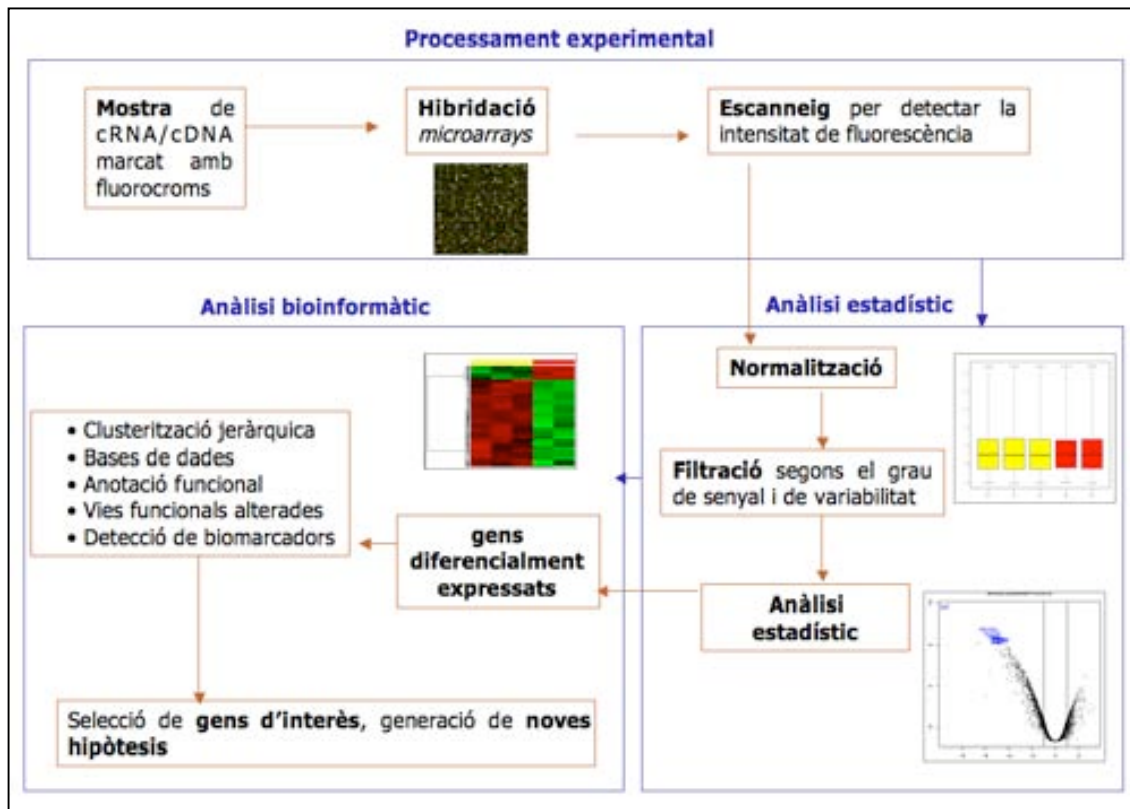


Figura 6. Anàlisi de perfils d'expressió gènica mitjançant *microarrays*.

Algunes de les aplicacions de l'anàlisi de perfils d'expressió gènica són per exemple estudiar l'efecte d'un estímul sobre un tipus cel.lular, comparar diferents estadis funcionals o bé comparar mostres patològiques i no patològiques [191].

6.2. APLICACIONS DELS PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA EN L'AUTOIMMUNITAT

L'anàlisi de perfils d'expressió gènica s'ha aplicat a les malalties autoimmunitàries per descriure variacions transcripcionals en un teixit afectat o un tipus cel.lular rellevant. Un dels tipus de mostra més utilitzats en l'anàlisi de perfils d'expressió en pacients amb autoimmunitat són les cèl.lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs), degut a la seva fàcil obtenció. El perfil d'expressió en PBMCs s'ha analitzat en diverses malalties autoimmunitàries [192] obtenint perfils distintius entre pacients i controls. Fins i tot hi ha anàlisis que han associat alteracions en un patró de trànscrips relacionats (*signature*) a un tipus de pacients, com per exemple l'augment d'expressió de gens de resposta a IFN en PBMCs de pacients amb lupud eritematós sistèmic (SLE) amb alts índex de severitat [193] o de pacients amb síndrome de Sjögren (SSj) amb alts títols d'autoanticossos [194]. Per tant, aquest tipus d'anàlisi podrien permetre desenvolupar aplicacions diagnòstiques/pronòstiques. Una aproximació d'aquest tipus es va fer en pacients de SLE a partir de mostres de PBMCs. Es va obtenir un índex transcripcional a partir dels valors d'expressió de mòduls de trànscrips, definits com a gens d'expressió coordinada i amb funcions semblants. L'índex transcripcional obtingut concordava en la majoria de pacients amb els índexs de severitat basats en paràmetres clínics [195]. En el cas de la DT1 també s'han

publicat dades d'expressió gènica en sang perifèrica [196-198]: en PBMCs de pacients diabètics s'ha descrit un augment d'expressió de gens de la família d'IL-1, quimiocines, receptors i molècules de senyalització i una disminució de gens d'apoptosi, cicle cel.lular i de la via del proteasoma. Un dels objectius de l'anàlisi de perfils d'expressió gènica en autoimmunitat ha estat la identificació de biomarcadors de progressió d'una malaltia. Amb l'objectiu de trobar biomarcadors d'inflamació solubles alterats en sèrum de pacients amb DT1 es van analitzar les variacions d'expressió de PBMCs al ser posats en cultiu amb sèrum de pacients amb DT1, mostrant diferències respecte el cultiu amb sèrums de controls. D'aquesta manera es van identificar un conjunt d'alteracions de gens relacionats amb la IL-1 que permeten discriminar entre pacients a l'inici de la DT1 i controls. A més, aquestes alteracions en trànscripats regulats per IL-1 es va detectar també en familiars sans de pacients amb risc que després van desenvolupar la malaltia, fet que suggereix una possible utilitat pronòstica d'aquest assaig. En la subpoblació dels monòcits de sang perifèrica, també s'han observat diferències en el perfil d'expressió de controls i pacients amb DT1, mostrant dos tipus de perfils en pacients: un perfil d'alteració de gens d'inflamació associat a l'inici de la malaltia en adults i un perfil d'alteració de gens de quimiotaxi, adhesió, motilitat i metabolisme associat a l'inici de la malaltia en edat juvenil [199]. A més de l'anàlisi del transcriptoma, existeixen tècniques basades en el mateixos principis però que analitzen perfils de molècules des de la perspectiva de la proteòmica o la metabolòmica. En la DT1, un treball recent amb una aproximació d'aquest tipus demostra com alguns metabòlits del sèrum poden ser útils per distingir entre individus progressors i no progressors, ja que mostren alteracions prèvies a les fases d'inici de l'aparició d'autoanticossos i d'inici clínic [200].

Pel que fa al teixit diana de l'autoimmunitat, diversos estudis han identificat perfils d'expressió en teixits afectats en pacients amb SLE [201], miositis idiopàtica inflamatòria (IIM) [202], esclerosi múltiple (MS) [203], SSj [194], RA [192], celiàquia [204], etc. En aquests teixits s'han descrit sobretot alteracions de gens del sistema immunitari, moltes d'elles comunes a diverses malalties autoimmunitàries. Alguns exemples són l'augment d'expressió de gens de resposta IFN, gens de presentació antigènica (gens HLA), d'immunoglobulines, de quimiocines i del sistema del complement. Una altra estratègia utilitzada és la sinèrgia entre l'anàlisi dels perfils d'expressió gènica al teixit diana i l'associació genètica de variants de polimorfismes. En celiàquia, partint de gens expressats diferencialment en biòpsies intestinals de pacients, es van seleccionar els gens situats en regions de susceptibilitat i d'aquests es van analitzar les variants al·lèliques dels gens amb polimorfismes associats a un efecte regulador de la transcripció, definint-se així noves associacions genètiques a la malaltia [204]. En la DT1, com ja s'ha dit, l'accés al teixit diana en pacients és limitat i per tant s'ha estudiat alternativament el perfil d'expressió gènica dels illots en models murins de DT1 com la soca NOD, el model transgènic pel TCR BDC2.5 [205] i el model de DT1 induïda amb ciclofosfamida [142]. Als illots d'aquests models s'ha observat un augment de gens regulats per IFN- γ , quimiocines, gens de

diferenciació d'illots de la família REG, i citocines proinflamatòries com la IL-17. També s'ha correlacionat un augment de trànscrips de cèl.lules NK amb una insulitis agressiva en models experimentals murins [163].

7. REGENERACIÓ DE CEL.LULES β EN LA DT1: PAPER DE LA FAMÍLIA REG

Quan es diagnostica la DT1, la major part de la població cel.lular β s'ha destruït. Tot i així, és possible detectar remanents de cèl.lules β en pacients diabètics de llarga evolució, ja sigui perquè aquestes han sobreviscut a l'autoimmunitat o bé degut a processos de regeneració. En pacients de DT1 fins 67 anys després del diagnòstic s'ha detectat apoptosi de cèl.lules β i presència d'infiltrat leucocitari, suggerint l'existència de mecanismes de regeneració endocrina [206]. Malgrat això, la capacitat de renovació de les cèl.lules β és molt baixa, essent aquest un factor predisposant en la destrucció autoimmunitària. Per poder restaurar la massa cel.lular β destruïda en pacients amb DT1, una possibilitat és el transplantament de pàncrees total o d'illots [207], però la funció de l'empelt després d'un transplantament d'illots té una durada limitada. Aquests són mètodes invasius, que impliquen la necessitat d'immunosupressors i a més cal afegir-hi la dificultat per obtenir donants –en els transplantaments d'illots cal més d'un donant per receptor-. Com a alternativa també s'està treballant en la diferenciació de cèl.lules endocrines a partir de cèl.lules mare embrionàries *in vitro* [208] i *in vivo* [209]. Una altra possibilitat és intentar potenciar la regeneració de les cèl.lules β endògenes. L'administració d'agents que promouen la regeneració β combinats amb immunoteràpies tolerogèniques s'apunta com una possible via per controlar l'autoimmunitat en la DT1 i s'està assajant en models experimentals [210]. Per tant, és important conèixer també els mecanismes endògens de regeneració de cèl.lules β i els factors que hi incideixen.

7.1 MECANISMES DE REGENERACIÓ DE CÈL.LULES β

S'han descrit diferents possibles mecanismes de regeneració de cèl.lules β . Un d'aquests és la replicació de cèl.lules β preexistents. Aquest sembla ser el mecanisme principal en ratolins adults [211, 212], però menys important en la DT1 humana [206, 213]. En humans, la taxa de replicació de cèl.lules β és limitada i sembla disminuir amb l'edat [214]. La neogènesi d'illots [215] a partir de progenitors endocrins immersos en els ductes pancreàtics (nesidioblastosi) sembla ser el procés fisiològic de formació dels illots durant el desenvolupament. En pàncrees de pacients amb DT1 s'han observat fenòmens de nesidioblastosi [46]. Un altre mecanisme proposat és la transdiferenciació de cèl.lules β a partir d'altres tipus cel.lulars pancreàtics (altres cèl.lules endocrines, cèl.lules ductals i acinars). En models experimentals *in vivo* s'ha observat la generació de cèl.lules β a partir de cèl.lules

ductals ja diferenciades, que retornen a un estat menys diferenciat per generar després cèl.lules β [216]. Aquests mecanismes s'esquematitzen a la **Figura 7**.

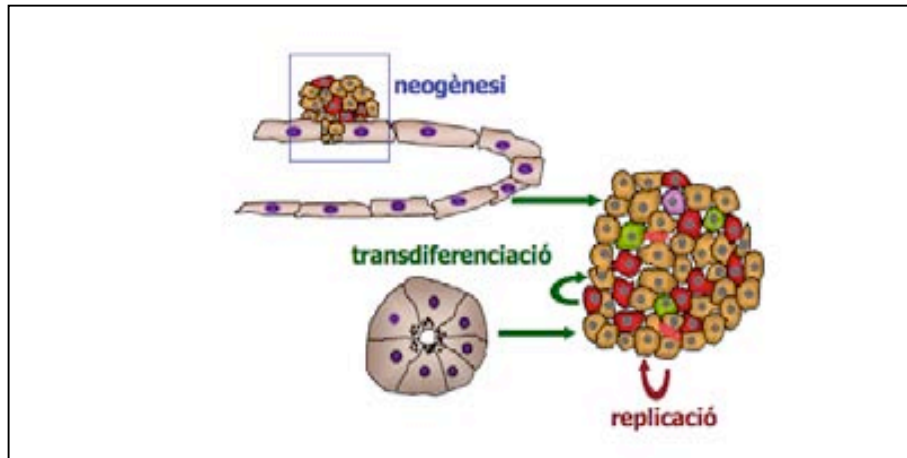


Figura 7. Principals mecanismes proposats de regeneració de cèl.lules β endògenes: neogènesi a partir de precursors ductals, replicació a partir de cèl.lules β preexistents i transdiferenciació a partir d'altres tipus cel.lulars endocrins o acinars

S'ha observat que hi ha factors biològics promouen la regeneració endògena de cèl.lules β . Alguns exemples són el pèptid similar a glucagó 1 (GLP-1) [217] i els seus anàlegs [218], la combinació d'EGF (factor de creixement epidèrmic) i gastrina [219] o la proteïna associada a neogènesi insular INGAP [220]. INGAP pertany a la família de proteïnes REG, una família de factors de proliferació de cèl.lules β .

7.2. FAMÍLIA REG –GENS DE REGENERACIÓ- EN LA DT1

La família de gens REG està formada per petites proteïnes d'uns 16 kDa relacionades estructuralment i funcional, i conservades en diferents espècies eucariotes. Són proteïnes secretades i contenen un domini lectina de tipus C. Segons el grau d'homologia de la seva estructura primària, les proteïnes REG s'han dividit en 3 subfamílies [221]: la primera inclou REG1A i REG1B (humans) i Reg1 (murí). La segona només conté el Reg2 (murí). La tercera subfamília està formada per REG3A i REG3G (humans) i Reg3a, Reg3b, Reg3g i Reg3d (murins). La proteïna INGAP (hàmsster) s'ha classificat també dins el tercer grup. REG4 (humà) i Reg4 (murí) formarien un quart grup [222]. En humans, els gens REG se situen en tàndem a la regió cromosòmica 2p12, excepte *REG4* que es troba a la regió 1p13.1-p12. En ratolí es troben també agrupats a la regió 6C3, amb l'excepció també de *Reg4* que es troba a la regió 3F3. Inicialment les proteïnes REG van ser identificades en els illots en regeneració d'un model de pancreatectomia (90%) de rata. En aquest model es va observar que l'administració de nicotinamida (inhibidor de poli-ADP ribosa) induïa un procés de regeneració dels illots pancreàtics, augmentant el nombre de cèl.lules β . A partir d'una llibreria de cDNA d'aquests illots en regeneració, es va aïllar per primera vegada el gen REG, expressat en illots en processos de regeneració i diabetogènesi, però no en condicions normals [221]. Es va localitzar

als grànuls secretors de les cèl.lules β [223]. En paral·lel també es va descobrir la proteïna PSP o litostatina al teixit exocrí, inicialment associada a una inhibició de la formació de càlculs pancreàtics. Posteriorment es va demostrar que REG1 i litostatina eren la mateixa proteïna [224].

REG1 α actua de forma autocrina i paracrina com a factor de proliferació de les cèl.lules β . S'ha observat que estimula la replicació de cèl.lules β *in vitro*. En el model de ratolí NOD que expressa transgènicament Reg a les cèl.lules β , les cèl.lules dels illots tenen una major capacitat proliferativa i es produeix un retard en l'aparició de la DT1. En canvi, els illots del ratolí *knockout* per Reg mostren una menor capacitat proliferativa [225]. A més, s'ha vist que l'administració de Reg en un model de diabetis induïda quirúrgicament millora el control de la glicèmia i augmenta la massa cel·lular β residual [138]. En el model NOD, l'administració de Reg1 en fase de pre-diabetis té un efecte protector. En canvi, en ratolins NOD que es troben ja en fase d'insulitis avançada i mostren alteracions en la tolerància a la glucosa, l'efecte antidiabetogènic de Reg1 té lloc només quan aquest s'administra en combinació amb una substància immunomoduladora, com és la linomida [226]. Reg té també un efecte mitogènic sobre una línia de cèl.lules ductals, una possible font de neoformació d'illots. Dins aquesta família trobem també la proteïna de hàmsster INGAP, que s'inclou dins el grup III i s'expressa en cèl.lules α . INGAP i el seu pèptid bioactiu derivat "pèptid INGAP" també s'han associat a processos de neogènesi insular i proliferació β en models animals [227].

La nomenclatura dels membres de la família REG és confusa en alguns casos, ja que ha anat variant en funció de la descripció de nous gens/proteïnes d'aquesta família. Les dades de la distribució tissular de les proteïnes REG tampoc són totalment concordants. La idea general més consensuada és que les proteïnes dels grups I i II s'expressen preferencialment en illots hiperplàsics o danyats i més dèbilment al teixit exocrí; les proteïnes del grup III s'expressen de forma més important al tracte gastrointestinal i més dèbilment al pàncrees; els membres del grup IV s'expressen al tracte gastrointestinal. A la **Taula 4** s'enumeren amb més detall els principals teixits d'expressió i processos patològics relacionats amb la família REG.

Taula 4. Factors de la família REG humans i murins, principals teixits d'expressió i patologies/processos associats

	HUMÀ	MURÍ	EXPRESSIÓ	PATOLOGIES/PROCESSOS ASSOCIATS
I	REG1α		Illots hiperplàsics i en diabetogènesi [221], teixit exocrí [228], sistema nerviós [224]	DT1 (regeneració β [221], autoantigen [229]), malalties neurodegeneratives [224]
	REG1β		Pàncrees [230]	
		Reg1	Illots hiperplàsics i en diabetogènesi [221], teixit exocrí [224]	DT1 (regeneració β [221])
II		Reg2	Illots hiperplàsics [231] (cèl.lules β [232]), ductes de glàndules salivals [232]	DT1 (regeneració β [232], autoantigen [232])
III	REG3α		Pàncrees [221], tracte gastrointestinal [233]	DT1 (autoantigen [234]), protecció antimicrobiana de la mucosa intestinal [235], malaltia inflamatòria intestinal [233]
	REG3γ		Pàncrees [236]	
		Reg3α	Pàncrees, porció no β dels illots [232], tracte gastrointestinal [237]	DT1 [205], pancreatitis [237], fibrosi cística [237]
		Reg3β	Pàncrees [232], tracte gastrointestinal [237]	DT1 [205], pancreatitis [237]
		Reg3δ	Pàncrees (teixit exocrí [238], illots [232])	
		Reg3γ	Pàncrees [231], tracte gastrointestinal [237], ductes de glàndules salivals [232]	DT1 [205], pancreatitis [237], protecció antimicrobiana de la mucosa intestinal [235], malaltia inflamatòria intestinal [239]
IV	REG4		Tracte gastrointestinal [240], carcinomes [241]	Carcinogènesi [241], malaltia inflamatòria intestinal [240]
		Reg4	Tracte gastrointestinal [242]	

El receptor de REG (*EXTL3*) [243] és una molècula de 105 kDa, el *locus* de la qual està situat a la regió 8p21 en humans i 14D1 en ratolí. S'expressa als illots pancreàtics –també en condicions basals- i en d'altres òrgans. Al contrari que dels seus lligands, la seva expressió als illots no augmenta en situacions de regeneració. Després de la unió amb el seu receptor, les proteïnes REG actuen a través de la via de senyalització de PI(3)K sobre el factor de transcripció ATF-2, que activa el promotor de la ciclina D1 [244], promovent el pas de la fase G1 a la fase S del cicle cel.lular. L'expressió dels gens de la família REG és induïble per diferents elements com la nicotinamida, la combinació d'IL-6 i dexametasona i l'IFN- γ . Aquests actuen sobre elements en *cis* situats al promotor dels gens REG [221, 245].

En la DT1 les proteïnes de la família REG podrien tenir-hi un paper dual, ja que algunes tenen un paper com a autoantígens. S'han detectat autoanticossos anti-REG1 α en el 25% de pacients amb DT1 i el 15% de pacients amb DT2. Aquests autoanticossos anti-REG1 α presents en el sèrum de pacients diabètics inhibeixen l'efecte proliferatiu de REG1 α *in vitro* [229]. A més, en el model murí NOD es va establir un clon esplènic de limfòcits T CD4⁺ -restringit per I-A^{g7}- que responia específicament a REG3A i mostrava reactivitat creuada amb antígens dels illots murins. Aquest clon tenia un efecte diabetogènic al ser co-transferit junt amb limfòcits T CD8⁺ [234]. Reg II, que s'expressa en cèl.lules β , també actua com a autoantigen en el model NOD. La immunització amb la part N-terminal de Reg II accelera la DT1. Contràriament, la immunització amb la regió C-terminal retarda l'aparició de la malaltia. Aquest efecte protector, mediat per limfòcits T CD4⁺, es va observar associat a un augment d'expressió de *Foxp3* als nòduls limfàtics regionals [232].

Estructuralment, la família REG són lectines de tipus C, amb un domini conservat de reconeixement de carbohidrats. A l'intestí, REG3A (humà) i Reg3g (murí) actuen com a mecanismes d'immunitat innata antimicrobiana per mantenir l'homeostasi entre la mucosa i flora intestinal. Aquestes lectines tenen un efecte bactericida contra bacteris grampositius. Aquest efecte és directe, a diferència d'altres lectines que actuen a través de l'activació del complement [235, 246]. A més, Reg3g media l'efecte antimicrobià de MyD88 -adaptador de la senyalització de TLRs- en les infeccions intestinals [246].

Els membres de la família REG participen en processos tan diversos com la proliferació de les cèl.lules β , la resposta antibacteriana i l'autoimmunitat, i són induïbles en situacions d'estrès, inflamació i regeneració. El paper d'aquestes proteïnes en la DT1 sembla ser dual, ja que els seus efectes poden tant promoure com contrarestar l'autoimmunitat, i podrien ser nous biomarcadors importants en la DT1.

8. MICROQUIMERISME MATERN I DT1

8.1. MICROQUIMERISME MATERN I FETAL

El microquimerisme (Mc) és la presència en un individu d'una quantitat reduïda de DNA o de cèl.lules provinents d'un altre individu genèticament diferent.

Durant la gestació, es produeix una transferència de cèl.lules entre mare i fetus a través de la placenta. El microquimerisme matern (MMc) es dona quan algunes cèl.lules maternes creuen la barrera fetoplacentària i passen al fetus. Aquest flux cel.lular a través de la placenta és bidireccional: també es dona microquimerisme fetal (FMc), quan són les cèl.lules fetals les que passen a la circulació materna [247, 248].

El fenomen del MMc va ser detectat inicialment en individus immunodeficients [249]. En aquests individus, els limfòcits T i B maternos podien proliferar normalment enfront a mitògens inespecífics però mostraven poca resposta enfront a una estimulació antigen-específica o al·logènica [250] i poca diversitat en el seu TCR [251]. Més endavant s'ha comprovat que les cèl.lules maternes persisteixen al llarg del temps en l'hoste, fins i tot dècades, i poden trobar-se tant en sang com en teixits d'individus adults [252]. Tot i que són una població semial·logènica, no són eliminades pel sistema immunitari de l'hoste. No se'n coneixen amb exactitud els mecanismes de tolerització, però se sap que ja des de l'època fetal es dona una resposta reguladora enfront als al·loantígens maternos mediada per Tregs [253].

En sang perifèrica i de cordó s'han trobat tant leucòcits maternos diferenciats com progenitors CD34⁺ [254]. Es creu que existeixen progenitors pluripotencials d'origen matern capaços de generar llinatges diversos, ja que s'han identificat cèl.lules maternes en diversos òrgans. Per exemple, s'han observat cèl.lules maternes en nòduls limfàtics, glàndula tiroide, timus, pulmó, cor, melsa, fetge, pàncrees, tracte gastrointestinal, pell, medul·la òssia, múscul esquelètic i en sang. El FMc (més freqüent i present en major nivell que el matern) s'ha descrit,

a més dels teixits anteriorment citats, en glàndules salivals, adrenals, ronyó, vesícula biliar, cèrvix [255].

Tot i que la principal font de Mc és el flux a través de la placenta, cal dir que també n'hi pot haver d'altres de menys freqüents. S'ha descrit, per exemple, la transferència de cèl.lules entre bessons a l'úter [256]. Tot i que no s'ha demostrat, teòricament les cèl.lules fetals podrien provenir d'un fetus d'un embaràs que no progressés degut a un avortament, d'un bessó no reconegut ni detectat que no s'arribés a desenvolupar i fins i tot de cèl.lules fetals d'un embaràs anterior. Altres fonts de quimerisme són les transfusions sanguínies, el transplantament de medul.la òssia i el d'òrgan sòlid. En ratolí s'ha descrit a més la transferència de cèl.lules a la progènie a través de la llet materna [257].

8.2. MICROQUIMERISME I MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES

Algunes malalties autoimmunitàries com el LES i les malalties autoimmunitàries de la tiroide (AITD), entre d'altres, són més freqüents en dones que en homes [258]. Possibles explicacions suggerides d'aquest biaix de gènere són: la desviació de la resposta immunitària segons els nivells hormonals cap a tipus Th1 (andrògens) o Th2 (estrògens), factors genètics de susceptibilitat localitzats al cromosoma X o bé influència del microquimerisme. Durant l'embaràs, certes malalties autoimmunitàries -com la malaltia de Graves- milloren i s'exacerben després en l'etapa postpart [258]. A més, a l'úter es crea un ambient de tolerància immunològica mitjançant mecanismes com l'expressió de la molècula immunoreguladora HLA-G al trofoblast fetal, afavorint una resposta reguladora enfront el fetus. Durant l'embaràs es donen una sèrie factors que modulen la resposta immunitària en el fetus. Un d'aquests factors podria ser la transferència materno-fetal de cèl.lules a través de la placenta.

En els darrers anys s'ha associat el MMc i el FMc amb l'autoimmunitat. Alguns autors han suggerit un paralelisme entre el Mc i la malaltia crònica de l'empelt contra l'hoste, amb característiques clíniques semblants a algunes malalties autoimmunitàries. En aquesta malaltia es dona una forma de quimerisme, ja que es produeix quan, després d'un transplantament al·logènic, els limfòcits del teixit del donant s'extravasen als teixits de l'hoste i generen una resposta immunitària contra aquest. Existeix certa controvèrsia sobre si realment les cèl.lules que constitueixen el Mc són capaces de desencadenar l'autoimmunitat, ja que també es troben en individus sans. En els darrers anys s'han realitzat diversos estudis sobre Mc en individus amb malalties autoimmunitàries, determinant-ne el nivell i el fenotip [254]. A la **Taula 5** es resumeixen les dades d'aquests estudis:

Taula 5. Microquimerisme i malalties autoimmunitàries

PATOLOGIA	TIPUS	TEIXIT	MICROQUIMERISME	FUNCIÓ SUGGERIDA
Síndrome lupus neonatal	matern	Cor, fetge	Major freqüència de cardiomiocits materns en pacients [259]	Diana de l'autoimmunitat / Regeneració
Dermatomiositis Juvenil	matern	Sang perifèrica, múscul	Major freqüència en pacients [260]	Cèl.lules autoreactives
Esclerosi sistèmica (SSc)	matern	Sang perifèrica, pell lesionada, teixits no afectats	Major freqüència en pacients (múltiples òrgans). Fenotip en pell afectada: cèl.lules dendrítiques, limfòcits T CD8 ⁺ , limfòcits B i cèl.lules epitelials materns [261, 262]	Cèl.lules autoreactives/ Cèl.lules epitelials "guiant" el procés autoimmunitari
Pitiriasi liquenoide	matern	Pell	Major freqüència en pacients, queratinòcits materns en pell afectada [263]	Diana de l'autoimmunitat / Regeneració
DT1	matern	Sang perifèrica, pàncrees	En pacients, major nivell de DNA matern en sang perifèrica, major % de cel.lules β d'origen matern [264]	Regeneració del teixit danyat
Cirrosi biliar primària (CBP)	fetal	Sang perifèrica, fetge	No hi ha diferències entre pacients i controls [265, 266], possible associació en subgrup de pacients amb escleroderma	No directament relacionat amb l'autoimmunitat en la CBP
LES	fetal	Múltiples òrgans	Major nivell en pacients, major nivell en òrgans danyats [267]	Reparació tissular
AITD	fetal	Glàndules tiroïdals	Major nivell en tiroiditis de Hashimoto i malaltia de Graves [268]	Possible relació amb l'autoimmunitat
SSc	fetal	Sang perifèrica, lesions de pell lesionada, teixits no afectats	Major nivell i freqüència en pacients en sang perifèrica i múltiples òrgans [269, 270]	Possibilitat que sigui tant causa com conseqüència de l'autoimmunitat

En algunes d'aquestes malalties s'han trobat cèl.lules d'origen matern diferenciades a llinatges propis de l'òrgan diana afectat. Un exemple és la síndrome de lupus neonatal, una malaltia autoimmunitària que s'adquireix a l'úter en algunes mares amb autoanticossos anti-Ro i anti-La. En teixit cardíac de nounats afectats es va observar una major freqüència de cèl.lules materns, sent la majoria d'aquestes positives per α -actina sarcomèrica. En pacients amb pitiriasi liquenoide, malaltia que causa una inflamació i infiltració de limfòcits T a la pell es va detectar un augment de queratinòcits materns [271]. En aquestes malalties s'ha hipotetitzat que les cèl.lules materns podrien ser les cèl.lules diana de l'autoimmunitat o bé estar contribuïnt a la reparació del teixit.

En d'altres patologies autoimmunitàries, es creu que el Mc podria tenir un efecte patogènic en la resposta contra els teixits propis. L'esclerosi sistèmica (SSc), és una malaltia autoimmunitària que afecta el teixit connectiu causant fibrosi, formació de dipòsits de colàgen a la pell i dany vascular. En pacients d'esclerosi sistèmica s'ha detectat una major freqüència de Mc en sang perifèrica (72% dels casos) respecte els controls (22%) [261]. En el mateix estudi es va observar que la majoria de cèl.lules d'origen matern eren limfòcits i cèl.lules dendrítiques i es van localitzar concentrades en zones de pell afectada. Els autors suggerien que les cèl.lules materns poden "guiar" el procés inflamatori [262]. En la dermatomiositis juvenil, malaltia autoimmunitària que afecta el múscul i la pell, també es va detectar un major nivell de MMc en sang perifèrica i en múscul de pacients. Es va descriure una associació positiva entre la freqüència de Mc i la presència de l'al.lel matern HLA-DQA1*0501, al.lel de susceptibilitat a la

malaltia [260]. A més, les cèl.lules T maternes de aïlades de sang perifèrica dels pacients produïen una resposta contra els al.loantgens de l'hoste.

Recentment, el MMC s'ha relacionat també amb la DT1. En un estudi comparatiu es va detectar una major prevalença i nivell de MMC en sang de pacients amb DT1 que en germans no afectats o en controls no relacionats [264]. En els individus heterozigots per l'haplotip DQB1*0302-DRB1*04, es va observar una freqüència de MMC superior quan aquest haplotip era heretat per via paterna. També es van detectar cèl.lules β maternes en pàncrees d'un pacient amb DT1 (constituïnt aproximadament un 1% de les cèl.lules β) i en 3 controls (nivells menors). Es va atribuir a les cèl.lules maternes un possible paper en la regeneració del pàncrees danyat en la DT1.

En conjunt, s'ha trobat un nivell major de cèl.lules maternes en sang perifèrica i en teixits diana de pacients amb diverses malalties autoimmunitàries. En els teixits diana la majoria de cèl.lules maternes són positives per a marcadors específics de teixit. Encara està per definir si tenen algun paper en l'autoimmunitat, però hi ha algunes hipòtesis a favor. Per una part es pensa que les cèl.lules maternes podrien ser les pròpies cèl.lules autoreactives [260, 262], si bé també podrien ser les cèl.lules diana de l'autoimmunitat [259, 263]. Una tercera hipòtesi és que contribueixen a l'intent de regeneració del teixit danyat [259, 263, 264]. Els principals mecanismes immunològics referents al possible paper de les cèl.lules maternes en les malalties autoimmunitàries s'esquematitzen a la **Figura 8**:

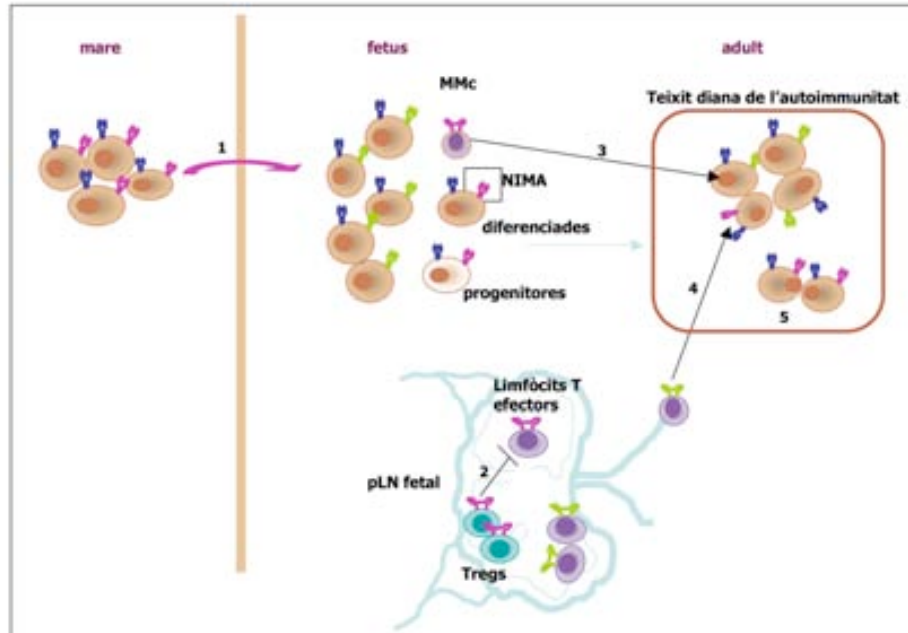


Figura 8. Processos immunològics associats a les cèl.lules maternes en el context de les malalties autoimmunitàries. Algunes cèl.lules maternes (progenitores i diferenciades) travessen la barrera fetoplacentària i s'implanten en teixits fetals (1). Les cèl.lules maternes expressen l'HLA matern no heretat (NIMA). En l'etapa fetal, existeixen mecanismes tolerogènics enfront als antgens maternes mediat per Tregs específics, que regulen la resposta efectora contra les cèl.lules maternes (2). Les cèl.lules maternes, es troben enriquides en òrgans de pacients afectats per autoimmunitat. Es creu que en algunes malalties autoimmunitàries podria haver-hi cèl.lules maternes limfoides autoreactives (3), cèl.lules maternes pròpies del teixit que podrien ser la diana inicial de la resposta autoimmunitària (4) i cèl.lules maternes amb capacitat de reparació tissular de les zones afectades (5).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI I OBJECTIUS

1. HIPÒTESI

Consideracions prèvies

En la DT1 humana s'han descrit fins l'actualitat un conjunt d'alteracions en illots de pacients, destacant la destrucció de cèl·lules β i la consegüent pèrdua d'autoantígens, la presència d'una insulitis moderada, la sobreexpressió de molècules de presentació antigènica i d'adhesió, indicis indirectes d'una infecció vírica –en alguns casos- i la presència de microquimerisme matern. No obstant, la manca d'accés al teixit diana en pacients amb DT1 fa que el nombre de mostres estudiades sigui molt escàs i limita enormement la descripció de nous fenòmens immunològics als illots pancreàtics. Fins al moment, no existeix una visió global de les alteracions de la resposta immunitària en pàncrees a nivell molecular. El nostre grup va obtenir al llarg dels anys una col·lecció de mostres de teixit pancreàtic de pacients amb DT1 en diferents fases de progressió de la malaltia, tant de pàncrees total com d'illots purificats. Aquest és un material exclusiu i, al tractar-se de teixit fresc congelat (no fixat), presenta una qualitat òptima per poder realitzar tant anàlisis d'expressió gènica a gran escala com estudis histològics. Paral·lelament, el nostre grup havia generat un model murí de DT1 experimental en el qual l'expressió transgènica d'IFN β simula l'efecte local d'una de les conseqüències d'una infecció vírica i desencadena una diabetis autoimmunitària, agressiva i més prematura que en la soca d'origen, el model murí espontani NOD, i amb característiques comunes amb la DT1 humana com l'edat d'inici i una incidència semblant entre sexes.

Hipòtesi

La hipòtesi de treball plantejada és que al teixit diana de la DT1 -humana i experimental- es donen processos d'inflamació i de resposta innata en paral·lel amb els de resposta específica contra les cèl·lules β , i que de forma concomitant es posen en marxa mecanismes compensatoris d'immunoregulació i de regeneració, desencadenant un balanç que fa que l'autoimmunitat es perpetui al llarg del temps. Les alteracions referents a aquestes vies funcionals afecten el teixit diana en diferents fases de progressió de la DT1 de forma molt més àmplia del que s'ha descrit fins ara.

2. OBJECTIUS

OBJECTIU GENERAL

L'objectiu general d'aquest estudi és identificar els fenòmens que contribueixen a la inflamació, immunitat innata i específica, immunoregulació, destrucció i regeneració al teixit diana de la DT1 en diferents fases de progressió de la malaltia.

OBJECTIUS CONCRETS

1. Establir la primera base de dades del transcriptoma del pàncrees i d'illots purificats de pacients en diferents fases de progressió de la DT1 (inici i cronificació). Identificar possibles noves vies implicades en l'autoimmunitat contra les cèl.lules β . Determinar el patró d'expressió tissular de gens alterats novament identificats amb possible rellevància per la malaltia.
2. Caracteritzar el microquimerisme matern, com a fenomen associat a l'autoimmunitat, en pàncrees de pacients amb DT1 en diferents fases de progressió de la malaltia. Identificar la presència de cèl.lules β maternes en illots pancreàtics humans.
3. Determinar l'expressió de factors immunològics relacionats amb la destrucció - progressió de la insulitis- i amb la regeneració mediada per la família de gens Reg, mitjançant un model experimental de DT1 amb un alt component de resposta innata.

MATERIAL I MÈTODES

MATERIAL I MÈTODES

1. SUBSTRATS

1.1. HUMANS

En aquest estudi es van utilitzar mostres de teixit pancreàtic de quatre pacients amb DT1 en diferents estadis de progressió de la malaltia. Com a controls, es van emprar mostres de pàncrees de donants d'òrgans; tots els controls van resultar ICA negatius, descartant així incloure individus en fase de pre-diabetis asimptomàtica. El pàncrees va ser extret en fase de mort cerebral. Les dades dels pacients i dels controls es resumeixen a la **Taula 6** i a la **Taula 7**. Cap dels pacients amb DT1 ni dels donants d'òrgans presentava característiques clíniques associades amb d'altres malalties autoimmunitàries. En tots els casos es va obtenir el consentiment informat i tots els protocols seguits de van ser aprovats pel Comitè Ètic de l'Hospital Germans Trias i Pujol.

Taula 6. Dades clíniques dels pacients i controls

Subjecte	Durada de la DT1	Edat (anys)	Sexe	Causa de la mort	Índex de massa corporal	ICA	Glicèmia	Pàncrees	Illots / Puresa
Cas 1	5 dies	19	dona	edema cerebral	20,9	positiu	648	sí	sí/ >90%
Cas 2	9 mesos	16	home	edema cerebral	<25	ND	285	sí	-
Cas 3	8 anys	29	home	edema cerebral	21,9	ND	146	sí	-
Cas 4	10 anys	26	home	traumatisme cranioencefàlic	23,4	ND	ND	sí	sí/ >90%
Control 1	-	30	dona	traumatisme cranioencefàlic	22,9	negatiu	257	sí	-
Control 2	-	21	home	traumatisme cranioencefàlic	23,1	negatiu	133	sí	-
Control 3	-	20	dona	aturada cardiorespiratòria	20,2	negatiu	271	sí	-
Control 4	-	31	home	accident cerebral vascular	<25	negatiu	ND	sí	-
Control 5	-	20	dona	traumatisme cranioencefàlic	<25	negatiu	ND	-	sí/ >80%
Control 6	-	19	home	traumatisme cranioencefàlic	23,5	negatiu	299	-	sí/ >90%
Control 7	-	48	home	traumatisme cranioencefàlic	<25	negatiu	126	-	sí/ >90%
Control 8	-	53	home	edema cerebral	24,1	negatiu	ND	-	sí/ >90%

ND : no determinat

Taula 7. Tipatge d'HLA dels pacients i controls

Subjecte	HLA-A*	HLA-B*	HLA-Cw*	HLA-DR*	HLA-DQ*
Cas 1	02/68	39/40	03/12	04/13	0302/0603
Cas 2	02/24	39/-	07/-	07/08	0202/0402
Cas 3	01/29	07/ 08	07/-	03/-	0201/-
Cas 4	01/30	18/40	03/05	03/04	0201/0302
Control 1	02/32	18/44	04/07	07/15	0202/0613
Control 2	26/-	35/55	03/04	04/16	0302/0502
Control 3	01/02	35/44	04/16	07/11	0202/0301
Control 4	02/32	44/-	02/16	04/11	0301/ 0302
Control 5	ND	ND	ND	ND	ND
Control 6	ND	ND	ND	ND	ND
Control 7	ND	ND	ND	ND	ND
Control 8	ND	ND	ND	ND	ND

Els al·lels de risc es mostren destacats en negreta; ND: no determinat. El tipatge d'HLA es va realitzar al LIRAD mitjançant PCR amb oligonucleòtids específics de seqüència (PCR-SSO) a partir de DNA extret de mostres de blocs de pàncrees.

1.2. MURINS

Part d'aquest estudi es va realitzar utilitzant ratolins de les soques NOD i NOD.*Scid* (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EEUU) i de la colònia CD-1 (Charles River Laboratories, Sta. Perpètua de la Mogoda, Barcelona). Es van generar les soques transgèniques NOD RIP-IFN β i NOD.*Scid* RIP-IFN β mitjançant retrocreuaments a partir de la colònia CD-1 RIP-IFN β , generada i cedida per la Dra. Fàtima Bosch (CBATEG, Universitat Autònoma de Barcelona) [186]. Els models transgènics resultants expressaven IFN β humà a les cèl·lules β dels illots pancreàtics, sota el control del promotor d'insulina I de rata (RIP) [181].

Els animals van ser estabulats al Centre d'Experimentació Animal de l'Hospital Germans Trias i Pujol, en condicions SPF, amb cicles de llum-fosc de 12h, condicions estables de temperatura i humitat i dieta estàndard *ad libitum*. Per detectar la DT1 es va dur a terme un control diari de la glucosúria (Chroma 1 Glucose strips, Menarini, Barcelona). En cas de positivitat, la diabetis es va confirmar mitjançant un control de la glicèmia amb un glucotest (Glucocard, Menarini), considerant-se diabètics els animals amb una glicèmia superior a 360 mg/dl en una determinació o superior a 180 mg/dl en dues determinacions consecutives. Els procediments es van seguir d'acord amb la normativa sobre experimentació amb animals de la Generalitat de Catalunya i van ser aprovats pel Comitè d'Ètica en Experimentació Animal de l'Hospital Germans Trias i Pujol.

1.3. LÍNIA CEL·LULAR NIT-1

La línia cel·lular NIT-1 (*American type culture collection*, ATCC CRL-2055) prové d'un insulinoma de ratolí NOD [272]. Les cèl·lules NIT-1 van ser cultivades en medi RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Paisley Regne Unit) suplementat amb L-glutamina 2mM, piruvat sòdic 1 mM, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina, β-mercaptoetanol 25 µM i un 10% de sèrum fetal boví o FBS (Gibco) a 37°C i 5% CO₂. Per tal d'estudiar l'efecte de l'IFNβ en cèl·lules β, el cultiu es va suplementar amb 50.000 U/ml d'IFNβ humà (Betaferon®, Shering, Madrid) durant 72 h. Com a control es van utilitzar cèl·lules en condicions basals. Es van tripsinitzar les cèl·lules i es va separar una fracció de cada mostra per una anàlisi posterior. La resta de cèl·lules van ser resuspeses en 800µl de TRIzol (Invitrogen) i congelades per la posterior extracció de RNA.

Per comprovar l'efecte de l'IFNβ humà en la línia murina es va determinar la inducció de MHC I en les cèl·lules NIT-1 estimulades (comprovació de l'efecte de l'IFNβ). Es van resuspendre 300.000 cèl·lules per en 1 ml de solució salina tamponada amb fosfat PBS (PBS 1x 0,5% FBS). Les cèl·lules es van rentar (centrifugant-les 6 min a 550 g a 4 °C) i incubar amb un anticòs primari de rata contra anti-H-2 (MHC I) (hibridoma M1/42.3.9.8.HLK/TIB-126, ATCC) a una dilució 1/2 en tampó PBS. Com a secundari es va utilitzar un anticòs de cabra contra Igs de rata marcat amb isotiocianat de fluoresceïna o FITC (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, EEUU), diluït a 1/50 en tampó PBS. Els anticossos es van incubar seqüencialment 30 min a 4°C, fent un rentat després de cada incubació (centrifugació de les cèl·lules a 550 g i eliminació del sobrenadant). Després d'un tercer rentat, les cèl·lules es van resuspendre en 200 µl de tampó PBS. La detecció i l'anàlisi es van fer mitjançant un citòmetre de flux FACScan Cell Analyzer (BD Biosciences, San Jose, CA, EEUU) i el programa CellQuest (BD Biosciences).

2. PROCESSAMENT DE PÀNCREES

2.1. HUMANS

Els pàncrees es van destinar per congelar blocs de teixit i/o per la purificació d'illots. Una part de la glàndula va ser dividida en blocs de 0,5 cm³ que van ser congelats en isopentà en un bany d'acetona freda i mantinguts en nitrogen líquid o a -70°C fins al moment de la seva utilització. En els casos 1 i 4 i en els controls 5, 6, 7 i 8, es van purificar els illots pancreàtics. Breument, tres quartes parts de la cua de la glàndula van ser digerides enzimàticament mitjançant mètode automatitzat [273] i purificats manualment (casos 1 i 4) o bé mitjançant un gradient de densitat (controls) [274]. Es va calcular la puresa dels illots respecte el teixit total (endocrí i exocrí), mitjançant una tinció de les mostres amb difeniltiocarbazona (DTZ), agent quelant de zinc que tenyeix específicament els illots, i posterior observació en un microscopi [274]. La puresa dels illots va resultar superior al 80% en tots els casos.

2.2. MURINS

Es va obtenir el pàncrees de ratolins NOD, NOD.*Scid* i CD-1, NOD RIP-IFN β , NOD.*Scid* RIP-IFN β i CD-1 RIP-IFN β . Es van sacrificar els animals i es va accedir als òrgans interns mitjançant laparotomia. El pàncrees va ser extret i congelat en isopentà en un bany d'acetona freda. Els blocs de teixit van ser conservats a -70°C .

Es realitzar un aïllament d'illots de ratolins de les soques NOD i NOD.*Scid* (tant de la soca salvatge com dels respectius models transgènics). Per canalitzar la solució de colagenasa cap al pàncrees, es van obstruir amb pinces mosquit l'ampul·la de Vater, la vesícula biliar i la branca esquerra del fetge, tal com s'observa a la **Figura 9**. Per digerir el pàncrees enzimàticament es van utilitzar 470 U/ml de colagenasa tipus IV (Worthington, Lakewood, NJ, EEUU) en solució salina tamponada de Hank (*Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS, Gibco) amb 0,35 g/l de NaHCO₃. Es van injectar 3 ml de la solució amb una xeringa i una agulla 30G a través del conducte colèdoc i la solució va difondre per tot l'òrgan.

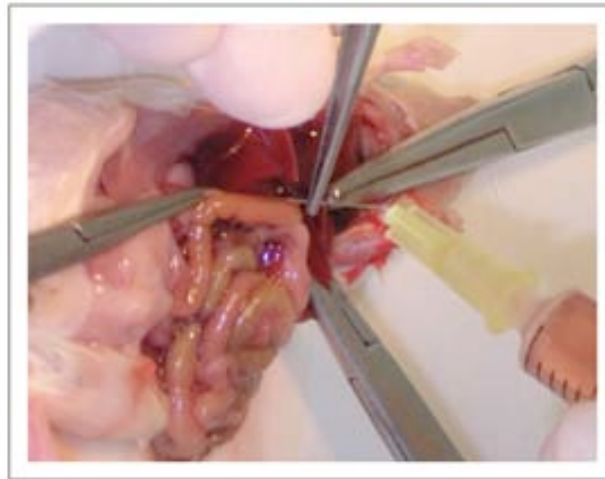


Figura 9: Injecció de solució de colagenasa al pàncrees a través del conducte colèdoc

El pàncrees va ser extirpat immediatament i digerit a 37°C durant 20 min. Ràpidament, es va aturar la reacció diluint la colagenasa en HBSS a 4°C . El pàncrees va ser digerit mecànicament i es va deixar sedimentar 5 min. Del sediment (illots i teixit exocrí), se'n van aïllar els illots manualment amb l'ajuda d'una lupa binocular. Cada mostra d'illots purificats va ser resuspesa en 800 μl de TRIzol (Invitrogen) i mantinguts a -70°C fins extreure'n el RNA.

Per obtenir cèl·lules endocrines en suspensió, es van disgregar part de les mostres d'illots. Es van rentar els illots per sedimentació 5 min a 4°C amb HBSS sense calci ni magnesi amb un 1% de FBS. Es va repetir el procés però sense FBS. Els illots es van incubar en 5 ml de tampó HBSS sense calci ni magnesi amb EDTA (0,2 mg/ml), HEPES (3,8 mg/ml) i BSA (10 mg/ml) durant 10 min a 37°C , per trencar les unions intercel·lulars. Els illots disgregats es van rentar amb HBSS amb 1% de FBS centrifugant-los 5 min a 170 g. Es va separar el sobrenadant i el sediment es va disgregar mecànicament durant 5 min. El sobrenadant es va afegir al

sediment disgregat. Les cèl·lules endocrines en suspensió es van centrifugar 6 min a 470 g i es van resuspendre en HBSS amb 30% de FBS. Per obtenir preparacions de monocapes cel·lulars, les cèl·lules endocrines es van centrifugar 5 min a 40 g en una centrífuga Cytospin3 (Shandon Scientific Ltd, Runcorn, Regne Unit).

3. HISTOLOGIA

3.1 HEMATOXILINA I EOSINA (H&E)

Es van obtenir crioseccions pancreàtiques murines i humanes de 5 µm de gruix que van ser assecades a l'aire i congelades a -70°C fins al moment de la seva utilització. Per tenyir-les, es van deixar les mostres assecar a l'aire durant 30 min. Es van tractar seqüencialment: 2 min en hematoxilina (Merck, Darmstadt, Alemanya), 10 s en aigua, 30 s en eosina, 10 s en etanol 70%, 10 s en etanol 95%, 2 min en etanol 100%, 1 min en xilol. Finalment, es van cobrir les seccions tenyides amb medi de muntatge DPX (BDH Laboratory Supplies, Poole, Regne Unit) i un cobreobjectes.

3.2. INDEX DE LA INSULITIS EN ILLOTS MURINS

Es van analitzar crioseccions consecutives de 5 µm de 4-7 zones de pàncrees no solapades de ratolins NOD i NOD transgènics. Mitjançant una tinció amb H&E i observació en un microscopi òptic es va determinar el grau d'insulitis d'un mínim de 20 illots diferents per animal. Es va assignar un valor de 0 a 4 a cada illot segons el grau d'infiltració observat: illot normal, peri-insulitis, insulitis lleu (<25% de l'illot), moderada (25-75%) o severa (>75% de l'illot), respectivament. Es va determinar l'índex d'insulitis de cada animal en funció de la mitjana ponderada del total d'illots analitzats [160, 181].

3.3. ANÀLISI MORFOMÈTRICA DE L'ÀREA INSULAR

Per tal de determinar l'àrea dels illots murins en el model murí RIP-IFNβ, es van analitzar illots de ratolins CD-1, NOD i NOD.Scid transgènics de quatre setmanes d'edat, comparant-los amb la soca salvatge respectiva. Es va mesurar l'àrea del teixit endocrí (descartant l'àrea amb infiltrat leucocitari) en seccions pancreàtiques tenyides amb H&E. Es van analitzar un mínim de 20 illots per animal i tres animals per condició. Per mesurar les àrees es va utilitzar el programa d'anàlisi d'imatge OpenLab 2.0 (Improvision, Coventry, Regne Unit).

3.4. DOBLE IMMUNOFLUORESCÈNCIA (IFL) INDIRECTA

Es van realitzar tincions mitjançant IFL indirecta de crioseccions de pàncrees humà i murí i de cèl·lules insulars adherides a portaobjectes. Les mostres van ser descongelades i assecades a l'aire durant un mínim de 30 min. Els anticossos primaris i secundaris utilitzats es van diluir en tampó fosfat (PBS) amb un 2% de FBS. Es va aplicar sobre cada mostra 50 µl del

primer anticòs primari a la seva dilució òptima, determinada empíricament. Les dilucions òptimes, condicions de temps i temperatura d'incubació de cada anticòs es mostren a la **Taula 8**. Totes les incubacions es van fer en cambra fosca i humida. Després del primer anticòs, es van fer dos rentats de 8 min amb tampó PBS. A continuació es van aplicar per mostra 50 µl d'anticòs secundari conjugat a un fluorocrom. De nou, es van fer dos rentats de 8 min amb tampó PBS. Es van incubar les mostres amb un segon anticòs primari (50 µl), tenint en compte que o bé el seu isotip o o bé l'espècie en la que es va generar fós diferent de la del primer anticòs primari, per evitar reaccions creuades. Després de dos rentats com els anteriors, es va aplicar un segon anticòs secundari conjugat a un fluorocrom amb un espectre d'emissió diferent del fluorocrom del primer anticòs secundari. Tot seguit es van fer dos últims rentats i finalment, es va afegir medi de muntatge a les mostres (Fluoprep®, bioMérieux S.A., Marcy l'Étoile, França), que es van cobrir amb un cobreobjectes i aquest es va segellar. En cada experiment es va incloure un control negatiu substituint l'anticòs primari per sèrum normal de la mateixa espècie que l'anticòs primari, diluït a l'1% en PBS, per descartar senyals generats per una unió inespecífica. L'observació de les tincions i la captura d'imatges es va fer mitjançant un microscopi de fluorescència (Carl Zeiss, Bernried, Alemanya) amb el programa d'anàlisi d'imatges OpenLab 2.0.

Taula 8. Anticossos utilitzats en les tincions mitjançant doble IFL indirecta. Característiques i condicions d'ús

MARCADOR	ISOTIP/ESPÈCIE/(clon)	FLUOROCROM	DILUCIÓ D'ÚS	CONDICIONS	FONT
CD19 humà	IgG2a, ratolí (clon A3B1)	-	sense diluir	16h a 4°C	Dr. R. Vilella, Hospital Clínic, Barcelona
CD209 (DC-SIGN) humà	IgG2b, ratolí (clon DCN46)	PerCP	1/100	16h a 4°C	BD Pharmingen, San Diego, CA, EEUU
CD3 humà	IgG1, ratolí (clon UCHT1)	-	sense diluir	16h a 4°C	Dr. P. Beverley, University College London, Regne Unit
CD36 humà	IgM, ratolí (clon CB38)	-	1/50	16h a 4°C	BD Pharmingen
CD4 humà	IgG2a, ratolí	-	sense diluir	16h a 4°C	Dr. R. Vilella
CD44 humà	IgG2a, ratolí (clon 2C5)	-	1/200	16h a 4°C	R&D Systems, Abingdon, Regne Unit
CD45 humà	IgG1, ratolí	-	sense diluir	16h a 4°C	Dr. R. Vilella
CD45 humà	IgG2a, ratolí	-	1/25	16h a 4°C	Dr. R. Vilella
CD68 humà	IgG1, ratolí (clon EMB11)	-	1/25	16h a 4°C	Dako, Carpinteria, CA, EEUU
CD8 humà	IgG2a, ratolí (clon UCHT4)	-	sense diluir	16h a 4°C	Dr. P. Beverley
CRP humana	IgG2a, ratolí (clon HD2-4)	-	1/50	16h a 4°C	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU
GAD humà	IgG2a, ratolí (clon GAD6)	-	1/600	4h a 4°C	Hybridoma Bank, Baltimore, MD, EEUU
GLUCAGÓ humà	IgG1, ratolí (clon GLU001)	-	1/50	30 min a TA	Dr. P. Jorgensen, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dinamarca
HLA-E humà	IgG1, ratolí (clon 3D12)	-	1/30 de stock 1 mg/ml	16h a 4°C	Dr. D. Geraghty, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA
INSULINA humana/murina	policlonal, conill d'índies	-	1/150	45 min a TA	ICN, Aurora, OH,
Reg1 murí	IgG2a, ratolí	-	1/500 de stock 6,83 mg/ml	1h a TA	Dr. S. Takasawa, Universitat de Tohoku, Japó
Reg2 murí	IgG policlonal, conill	-	1/100 de stock 7,7 mg/ml	1h a TA	Dr. W. Gurr, Universitat de Yale, New Haven, CT, EEUU
REG3A humà	policlonal, cabra	-	1/100	16h a 4°C	Santa Cruz Biotechnology
Ig de cabra	policlonal, conill	Alexa488	1/600	30 min a TA	Molecular Probes, Leiden, Països Baixos
Ig de conill d'índies	policlonal, cabra	TRITC	1/200	30 min a TA	ICN
IgG de conill	policlonal, cabra	FITC	1/100	30 min a TA	Southern Biotechnology Associates
IgG1 murina	policlonal, cabra	TRITC	1/200	30 min a TA	Southern Biotechnology Associates
IgG1 murina	policlonal, cabra	Alexa488	1/600	30 min a TA	Molecular Probes
IgG2a murina	policlonal, cabra	Alexa488	1/800	30 min a TA	Molecular Probes
IgG2a murina	policlonal, cabra	TRITC	1/200	30 min a TA	Southern Biotechnology Associates
IgG2b murina	policlonal, cabra	Alexa546	1/300	30 min a TA	Molecular Probes
IgM murina	policlonal, cabra	FITC	1/100	30 min a TA	Southern Biotechnology Associates

TA: temperatura ambient

Per tal d'analitzar la composició fenotípica de la insulitis en els 4 casos de pacients amb DT1, es van tenir seccions pancreàtiques mitjançant doble IFL indirecta amb anticossos específics per marcadors leucocitaris (CD3, CD4, CD8, CD19, CD68, CD209) i insulars (GAD, glucagó, insulina). Es va fer un recompte de 50-100 illots per cas, pertanyents a 5 regions diferents de 2-3 blocs de pàncrees. Es van considerar infiltrats els illots amb presència d'almenys una cèl.lula amb marcatge clarament positiu tant dins els illots (insulitis) com a la zona immediatament circumdant (peri-insulitis).

4. MICROARRAYS

4.1. MICROARRAYS DE cDNA

Per determinar l'expressió gènica d'illots murins es van hibridar mostres de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β en *microarrays* de cDNA de baixa densitat.

4.1.1. Obtenció de RNA

Es van descongelar mostres d'illots murins conservats en TRIzol i es van incubar cinc min a temperatura ambient. S'hi van afegir 160 μ l (1/5 volum) de cloroform, agitant vigorosament 15 s. Es van centrifugar 15 min a 12000 g i a 4°C, diferenciant-se tres fases. Es va transferir la fase superior (RNA) a un nou eppendorf i s'hi va afegir 1 μ l de glucogen (20 mg/ml) (Roche, Manenheim, Alemanya) i 400 μ l (1/2 volum inicial) d'isopropanol, agitant suaument. Es van mantenir 10 min a temperatura ambient, es van centrifugar 10 min a 12000 g i a 4°C, precipitant així el RNA. Es va eliminar el sobrenadant de les mostres i s'hi van afegir 800 μ l d'etanol 75%. Es van centrifugar 5 min a 7500 g i a 4°C i se'n va descartar el sobrenadant. Es va deixar assecar el botó de RNA a l'aire i es va resuspendre en 30 μ l d'aigua tractada amb dietilpirocarbonat (DEPC) (Sigma-Aldrich, Madrid), agent inhibidor de RNAses. Per evitar contaminacions amb DNA genòmic, es va fer un tractament de les mostres amb DNAsa I (2 U/ μ l) (Ambion, Austin, Texas), seguint el protocol recomanat. Finalment, es van fer *pools* de RNA de 3-5 animals per condició, que van ser purificats i concentrats mitjançant columnes de sílica (RNeasy MinElute Cleanup kit, QIAGEN, Hilden, Alemanya), seguint el protocol recomanat.

4.1.2. Anàlisi de la integritat del RNA

Es va preparar un gel d'agarosa a l'1% en condicions desnaturalitzants amb 5 ml de tampó MOPS 10x (MOPS 0,4M, acetat sòdic 0,1M, EDTA 0,01M) i 830 μ l de formaldehid 37% (12,3M) per 50 ml. Per desnaturalitzar el RNA es va preparar per cada mostra la reacció següent:

RNA	2 μ g
Formamida 100%	5 μ l
Formaldehid 37%	1,5 μ l
MOPS 10x	1 μ l

Es van desnaturalitzar els RNAs 5 min a 68°C i posant-los ràpidament en gel; s'hi van afegir 0,8 μ l de bromur d'etidi i 3,5 μ l de tampó de càrrega, es van carregar al gel i es van sotmetre a una electroforesi a 70V durant 35 min amb MOPS 1x com a tampó d'electroforesi. Es va comprovar la integritat mitjançant la detecció de les dues bandes corresponents a les subunitats de RNA ribosòmic 18S i 28S en un transil.luminador de llum UV.

4.1.3. Retrotranscripció i marcatge directe de cDNA

El RNA va ser retrotranscrit utilitzant un kit comercial (CyScribe First Strand cDNA labelling kit, Amersham Biosciences, Freiburg, Alemanya), que alhora incorporava nucleòtids conjugats amb un fluorocrom (Cy3 o Cy5), obtenint el cDNA marcat. Es va incorporar a les mostres una petita fracció de RNAs d'*Escherichia coli* (Memorec's, Miltenyi Biotec, Alemanya) com a control del marcatge en la hibridació de *microarrays*. Per al pas de desnaturalització es va preparar per cada tub:

RNA total	15 µg (ajustant a 9 µl amb aigua DEPC)
RNA <i>E.coli</i> 1	0,5 µl (10 fmol/µl de transcrit CR1)
RNA <i>E.coli</i> 2	0,5 µl (5 fmol/µl de CR2a, 2,5 fmol/µl de CR2b i 1 fmol/µl de CR2c)
oligo-dT	1 µl (CyScribe First Strand cDNA kit)

Les mostres es van incubar 5 min a 70°C i tot seguit 10 min a temperatura ambient i es van mantenir en gel. Es va afegir a cada mostra:

5x Buffer CyScript	4 µl
0,1M DTT	2 µl
dUTP mix	1 µl
Cy3/Cy5 dUTP	1 µl
Transcriptasa reversa (100U/µl)	1 µl

La reacció de transcripció reversa es va realitzar a 42°C durant 60 min, obtenint cDNA. Per eliminar les restes de RNA inicial es va afegir a cada mostra 2 µl de NaOH 2,5M i es van incubar 15 min a 37°C. Tot seguit s'hi van afegir 10 µl de tampó HEPES 2M. El cDNA marcat es va purificar utilitzant un sistema comercial (CyScribe GFX Purification kit, Amersham Biosciences), seguint el protocol recomanat. Es va obtenir cada cDNA marcat purificat en un volum de 120 µl de tampó d'elució. Els cDNAs es van concentrar evaporant les mostres amb un sistema de buit durant 45 min. Un 10% del volum de cada mostra es va concentrar per separat i resuspendre en 2 µl de tampó d'elució del kit CyScribe GFX Purification per mesurar la quantitat de fluorocrom incorporat en un espectrofotòmetre (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EEUU).

4.1.4. Hibridació i anàlisi

Es va utilitzar un *microarray* de baixa densitat dissenyat "a la carta" pel nostre grup, incloent 180 cDNAs de gens relacionats amb la inflamació i el sistema immunitari i marcadors d'illots pancreàtics. Els *microarrays* van ser generats comercialment (PIQOR™ cDNA arrays, Memorec's, Miltenyi Biotec, Alemanya), contenint quatre rèpliques de cada cDNA. Les hibridacions es van realitzar al Servei de Microarrays i Seqüenciació de la Universitat Autònoma de Barcelona, seguint el procediment següent: es va realitzar un pre-tractament dels

microarrays, submergint-los en aigua milliQ a 95°C durant 2 min i posteriorment en etanol absolut durant 30 s. Es van pre-hibridar els *microarrays* amb 100 µl solució de pre-hibridació (Memorec's) a 62°C durant 30 min en una cambra d'hibridació (Array Booster, Advalitix, Alemanya) i es van rentar en aigua milliQ. Es va pre-escalfar la solució d'hibridació 2x (Memorec's) a 42°C per redissoldre's i es va diluir a 1x amb aigua milliQ. Es va dissoldre cada cDNA en 50 µl de solució d'hibridació 1x i es van barrejar les els cDNAs a comparar en cada cas (un marcat amb Cy3 i l'altre amb Cy5). Es van incubar 2 min a 65°C i hibridar amb els microarrays a 62°C durant 16 h. Posteriorment els microarrays es van rentar 3 vegades amb una primera solució de rentat 1 i 2 vegades amb una segona solució de rentat (Memorec's). Els rentats es van fer a 50°C en agitació. Finalment, els *microarrays* van ser escanejats (ScanArray 4000, GSI Lumonics, Boston, MA EEUU) i analitzats (programa QuantArray, GSI Lumonics), obtenint la relació entre les intensitats de fluorescència de les mostres comparades (mostra problema/mostra control), per cada gen. Les intensitats es van normalitzar respecte les dels controls de marcatge (cDNA d'*E. Coli*). Les hibridacions es van realitzar per triplicat, incloent una hibridació amb intercanvi de fluorocroms entre les mostres a comparar (*dye swap control*). Es van obtenir valors corresponents a la variació de l'expressió gènica dels illots del model NOD RIP-IFNβ respecte els NOD no transgènics.

4.2. MICROARRAYS D'OLIGONUCLEÒTIDS D'ALTA DENSITAT

Pels estudis d'expressió gènica en mostres humanes es va utilitzar la tecnologia dels *microarrays* d'oligonucleòtids d'alta densitat. Es van comparar els perfils d'expressió gènica de pàncrees i illots de pacients amb DT1 amb els de donants d'òrgans sans (controls). Es va obtenir el perfil d'expressió gènica de cada pacient de forma individual. En el cas de blocs de pàncrees total es va comparar la mitjana dels valors de tres blocs de cada pacient amb la mitjana de tres blocs de controls, cadascun d'un control diferent; en el cas dels illots purificats, es van comparar els valors d'una mostra d'illots de cada pacient (casos 1 i 4) amb la mitjana de tres mostres corresponents a tres donants d'òrgans diferents. A la **Figura 10** s'esquematitza aquest disseny experimental.

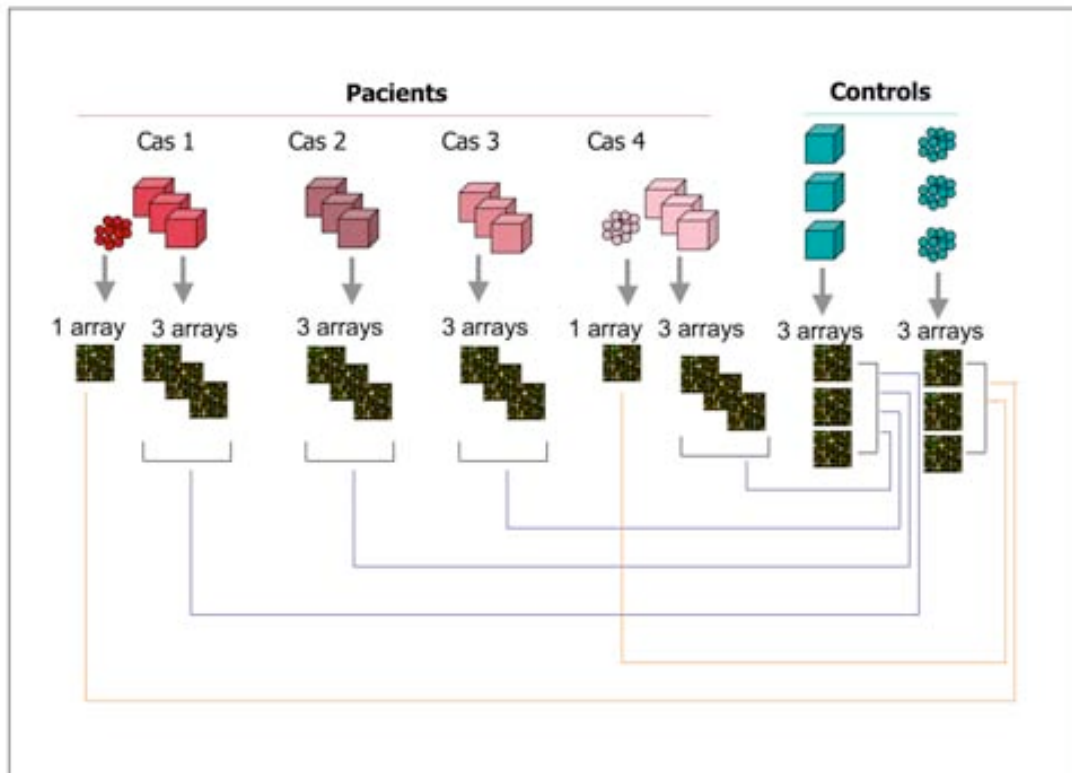


Figura 10. Comparacions realitzades mitjançant *microarrays* en mostres pancreàtiques humanes.

4.2.1. Processament de les mostres i hibridació

Es va extreure RNA de blocs de teixit pancreàtic (disgregat mecànicament a partir de seccions de criostat) i d'illots purificats de quatre pacients amb DT1 i tres controls mitjançant el kit comercial RNeasy Micro (QIAGEN, Hilden, Alemanya). Es va comprovar la integritat del RNA obtingut mitjançant electroforesi en gel desnaturalitzant i mitjançant l'equip 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EEUU). Amb aquest sistema, les mostres utilitzades per la hibridació de microarrays van mostrar uns valors de RIN (*RNA integrity number*) d'entre 6,2 i 7,9 –suficient per assegurar la qualitat de les hibridacions-. Les hibridacions es van realitzar al Servei de Microarrays de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron. Breument, es van retrotranscriure 3,5-5 µg de RNA a cDNA amb el One Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). El cDNA es va purificar mitjançant el sistema GeneChip® Sample Cleanup Module, Affymetrix), es va fragmentar i se'n va comprovar la integritat. Amb aquestes mostres es van hibridar *microarrays* d'oligonucleòtids d'alta densitat (GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0, Affymetrix) que contenien sondes per 47000 trànscrips corresponents a 38500 gens. Cada trànscrit estava representat per 11 sondes de 25 nucleòtids. Després de la hibridació, els arrays es van escanear (Affymetrix G3000 GeneArray Scanner, Affymetrix) i les dades es van processar amb el paquet informàtic Microarray Analysis Suite 5.0.

4.2.2. Anàlisi estadística i bioinformàtica

L'anàlisi estadística de les dades crues obtingudes mitjançant *microarrays* va ser realitzada al Servei d'Estadística de la Universitat de Barcelona. Es van normalitzar les dades crues d'expressió segons un mètode utilitzat per analitzar *arrays* de tipus *Affymetrix* i que es coneix com a RMA (*Robust Multichip Average*) [275]: es va corregir el senyal obtingut per cada sonda segons el senyal i el soroll de fons global, es va normalitzar el senyal de les sondes i es va obtenir una mesura absoluta de cada conjunt de sondes d'un transcrit. Els valors normalitzats dels 47.000 transcrits es van filtrar de forma no específica: primer es van eliminar els grups de sondes que no assolien un llindar mínim de senyal en tots els grups (filtre segons el grau de senyal) i d'aquests es van mantenir només els que mostraven una desviació estàndard superior al tercer quartil de totes les desviacions estàndard (filtre segons el grau de variabilitat). La llista de grups de sondes obtinguda va ser analitzada estadísticament mitjançant el programa Bioconductor. Es va aplicar el model empíric de Bayes, similar a un test t-Student, però amb una modificació empírica de la variança (modificació de Bayes) per a una millor estimació d'aquesta. Es van obtenir els valors de p ajustats segons la probabilitat d'obtenir falsos positius (*false discovery rate*, FDR). Es van considerar com a gens expressats diferencialment en mostres de pacients amb DT1 aquells amb un valor de p (no ajustat) $\leq 0,05$, en comparació amb la mitjana dels valors d'expressió en les mostres control. Es va realitzar una anàlisi del significat biològic dels gens expressats diferencialment ($p < 0,05$): se'n va obtenir informació en bases de dades com *Gene Expression Omnibus*, *ArrayExpress*, *SymAtlas*, *Entrez Gene*, *GeneCards*, i es va generar una base de dades pròpia recopilant la informació més rellevant. Es va determinar l'anotació funcional dels gens diferencialment expressats, agrupant-los en categories. A més de les bases de dades citades, es van analitzar els resultats mitjançant el programa Ingenuity Pathway Analysis o IPA (Ingenuity® Inc.). Es van determinar les vies de senyalització canòniques de la base de dades del sistema IPA significativament alterades, calculant la relació entre el nombre de gens diferencialment expressats pertanyents a una via i el nombre total de gens dels que consta aquesta via. Es va aplicar el test de Fisher per determinar-ne la significació estadística.

5. PCR QUANTITATIVA (qPCR)

Per validar els resultats dels *microarrays* es va analitzar l'expressió d'una selecció representativa de gens mitjançant qPCR.

5.1. TRANSCRIPCIÓ REVERSA

Per obtenir cDNA, es va realitzar una transcripció reversa partir d'1µg de RNA (blocs de pàncrees/illots murins) o bé de 200 ng de RNA (illots humans). Es va desnaturalitzar el RNA, ajustant fins a 10,5 µl amb aigua DEPC, durant 5 min a 68°C i es van mantenir en gel durant 5

min. Es va utilitzar la transcriptasa reversa del virus de la leucèmia murina de Moloney (MMLV) (Promega, Madison, WI, EEUU). Per cada mostra de RNA es va afegir els següents reactius:

Tampó MMLV 5x (Promega)	4µl
Oligo-dT 0,5 µg/µl (GeneLink, Hawthorne, NY, EEUU)	2µl
dNTPs 10mM (Ecogen, Barcelona)	2µl
MMLV 200 U//µl (Promega)	1µl
RNAsin 40 U//µl (Promega)	0,5µl

Tot seguit, es van mantenir les reaccions 10 min a temperatura ambient per facilitar la unió de l'oligo-dT al RNA. La reacció de transcripció reversa es va realitzar durant 60 min a 42°C, i després 15°C a 70°C per degradar el RNA.

5.2. qPCR AMB SYBR GREEN I

El sistema SYBR Green I mesura la quantitat d'amplímer que es va sintetitzant al llarg del procés d'amplificació en la qPCR, ja el SYBR Green I s'intercala en el DNA de cadena doble i emet fluorescència. En el nostre cas es van analitzar mostres de cDNA de pàncrees i d'ïllots pancreàtics de pacients amb DT1 i controls. Es van analitzar 21 gens que havien mostrat variacions significatives d'expressió mitjançant *microarrays*. Els encebadors utilitzats (**Taula 9**) van ser dissenyats amb el programa *Oligo*, excepte per als gens hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa 1 (*HPRT1*) i insulina (*INS*) descrits prèviament [276, 277].

Taula 9. Encebadors utilitzats en la qPCR amb el sistema SYBR Green

Gen	Sentit	Antisentit	Amplímer (parells de bases)	Temperatura hibridació (°C)	Temperatura amplificació (s)
NMES1	5'-ATTCCCTGGTGGTGTTCAT-3'	5'-TTTTTTTTTCGATCAAGGATCA-3'	101	58	7
CRP	5'-TCCTATGTATCCCTCAAAGCA-3'	5'-GGTGGCATACGAGAAAATACT-3'	117	60	8
REG3A	5'-CCTGTCGAGAAGCACAGC-3'	5'-GGGAGGAAGAAACAGAAAGAAA-3'	232	57	12
TLR3	5'-ACACCATCTCAAACTGGA-3'	5'-AAACCCCTGGAGAAAAT-3'	397	57	17
CD44	5'-TGAGCATCGGATTTGAGAC-3'	5'-GTGTCATACTGGGAGGTGT-3'	139	57	8
HLA-E	5'-TCTCCGAGCAAAAGTCAAA-3'	5'-GAGATGGGGTGGTGTGAGTC-3'	160	57	8
TRAIL	5'-GTCTCTCTGTGTGGCTGTAA-3'	5'-CTCAAATCATCTTTCTAACG-3'	201	57	10
IFNAR2	5'-AACACGAACACTGTGTATCT-3'	5'-GTGCACTATGGTGTGCTG-3'	184	57	10
IL-8	5'-TACTCCAAACCTTTCCACC-3'	5'-AACCTACAACAGCCAC-3'	288	57	12
CXCL1	5'-GTTAATATTTCTGAGGAGCTGC-3'	5'-AAACAGTTACAAAACAGATGTGC-3'	128	57	8
INS	5'-AAGCGTGGCATTGTGGAAC-3'	5'-CAAGGGCTTTATTCATCTCTC-3'	138	60	8
PNLIP	5'-GAGCAGTAGCAGGAAAAGAAGT-3'	5'-TTAGTATATAGGAGGAAGCGGG-3'	145	57	12
CD36	5'-GACAGTTTTGGATCTTTGATG-3'	5'-CTTTGCTTAACCTTGAATGTTG-3'	76	57	7
ERAP2	5'-TCTACTATCCACTCTCCAACT-3'	5'-GTCTCCCTATATGTAATGAGG-3'	126	57	7
S100A8	5'-GATGACCTGAAGAAATTGCT-3'	5'-ATATCCAACCTTTGAACCAG-3'	86	57	5
PPY	5'-TGCCCAGGGAGCCCACTG-3'	5'-CTAGGCCTGGTGTGATGTTGA-3'	114	57	7
HSPA6	5'-GAGATGAACCTTCCCTCCAAAGC-3'	5'-TTGAAGCAGAAGAGGATGAACCG-3'	98	57	7
LYZ	5'-GGGCTTGTCTCCTTTCTGTT-3'	5'-GTTGTAACCACTCTCCCATTTG-3'	150	57	7
CXCL12	5'-AACGTCAAGCATCTCAAATT-3'	5'-CTTGTCTGTTGTTGTTCTTCA-3'	82	57	7
REG4	5'-GGGTGGGAACAAGCACTG-3'	5'-GTCTCTAAGCCTAAAAAGCC-3'	260	57	15
INSR	5'-GGAACACAGCGTGCGAAT-3'	5'-GAAGAAGCGTAAAGCGGTG-3'	229	57	12
HPRT1	5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'	5'-GGTCTTTTACCAGCAAGCT-3'	94	57-60	5-17

La reacció de ciclat i adquisició de la fluorescència es va dur a terme en un equip LightCycler480 (Roche), en plaques de 96 pous. Cada reacció es va analitzar per triplicat. Per cada pou, es va preparar la reacció següent en un volum final de 10 µl:

- 5 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master 2x (Roche)
- 1 µl encebador sentit 5 uM (0,5 µM concentració final) (Invitrogen)
- 1 µl encebador antisentit 5 uM (0,5 µM concentració final) (Invitrogen)
- 0,5 µl aigua
- 2,5 µl cDNA diluït 1/5

La reacció d'amplificació va constar dels següents passos:

A. Pre-incubació de 10 min a 95°C

B. Amplificació (45 cicles) incloent:

- 1) desnaturalització de 5 s a 95°C
- 2) hibridació durant 10 s a la temperatura òptima pels encebadors
- 3) extensió a 72°C i adquisició de la fluorescència, variant el temps d'extensió segons la mida de l'amplímer com s'especifica a la **Taula 3**.

C. Fusió

- 1 s a 95°C
- 1 min a 65°C
- augment gradual de temperatura fins a 95°C amb adquisició contínua de la fluorescència

D. Refredament (10 s a 40°C)

L'especificitat dels amplímers es va comprovar mitjançant la temperatura de fusió (**Figura 11**) i una electroforesi en gel d'agarosa al 2%. Per l'anàlisi es va utilitzar un mètode de quantificació relativa ($2^{-\Delta\Delta C_p}$) [278] respecte un gen d'expressió constitutiva (*HPRT1*) i una mostra calibradora (on no varia l'expressió dels gens a quantificar). Com a mostra calibradora es va utilitzar un pool de tots els cDNAs controls en cada cas.

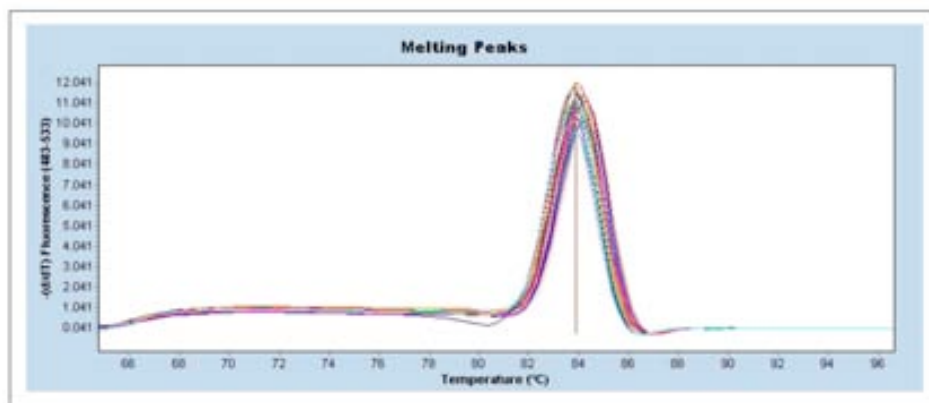


Figura 11. Exemple de corba de fusió corresponent a l'amplímer de proteïna C reactiva (CRP)

5.3. qPCR AMB SONDES TAQMAN

Aquest mètode també mesura la quantitat d'amplímer segons la fluorescència, però en aquest cas a més dels encebadors hi ha una sonda complementària a l'amplímer conjugada a un fluoròfor i un *quencher*. La fluorescència augmenta a mesura que la polimerasa, al sintetitzar l'amplímer, escindeix la sonda i separa el fluoròfor del *quencher*. Els encebadors i les sondes Taqman van ser dissenyats i generats comercialment (sistema *Assays on Demand*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU): *Reg1* (Mm00485651_m1), *Reg2* (00485653_m1), *Ilf6* (Mm00446190_m1), *Cxcl10* (Mm00445235_m1), *Ccl5* (Mm01302428_m1), *Gapdh* (Mm99999915_g1) i 18S (Hs03003631_g1). Les amplificacions es van dur a terme en un equip ABI 7900HT (Applied Biosystems) en plaques de 384 pous. Per cada mostra es va preparar la reacció següent:

6,25 µl TaqMan Universal Master Mix 2x
 0,625 µl Encebadors i sonda 20x Assay on Demand
 3,125 µl aigua
 2,5 µl cDNA diluït 1/5

Es van utilitzar les condicions universals d'amplificació del sistema Taqman: desnaturalització de 10 min a 95°C i 40 cicles de 15 s a 95°C i 1 min a 60°C. La quantificació relativa de l'expressió gènica es va calcular segons el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

6. DETERMINACIÓ DE CITOCINES I QUIMIOCINES MITJANÇANT ARRAYS DE PROTEÏNA

Es van determinar les citocines i quimiocines presents al pàncrees de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β diabètics mitjançant *arrays* de proteïna de baixa densitat. Es va utilitzar el sistema comercial RayBio™ Mouse Cytokine Array (RayBiotech, Atlanta, GA, EEUU, que consisteix en membranes on hi ha disposats 32 anticossos contra diferents citocines i quimiocines (**Figura 12**). Es es va obtenir un extracte proteic de crioseccions pancreàtiques de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β , comprovant la presència d'un mínim de tres illots per zona mitjançant tinció amb blau de metilè i observació al microscopi. Per l'extracció proteica es va emprar el tampó de lisi inclòs en el kit comercial diluït a 1x amb aigua destil·lada i afegint-hi inhibidors de proteases (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Calbiochem, Beeston, Regne Unit) a una dilució 1/200 en el volum final de lisi. Es van centrifugar les mostres i recuperar el sobrenadant (extracte proteic pancreàtic). La quantitat de proteïna de cada extracte es va determinar utilitzant una solució de Blau de Comassie (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich). Es van incubar 50 µl de mostra amb 2,5 ml de Blau de Comassie durant 10 min a temperatura ambient en la foscor i es va mesurar l'absorbància de les mostres en un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595 nm. La concentració de cada extracte es va extrapolar a partir d'una corba patró, establerta a partir de dilucions seriades d'una mostra proteica de concentració

coneguda (N Protein Standard SL, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Alemanya). Cada membrana o *array* de proteïna es va incubar amb 500 µg de proteïna total (*pool* de cinc extractes de ratolins diferents per cada condició), seguint el protocol comercial. Breument, es van incubar els lisats proteics a les membranes que contenien els anticossos anti-citocines i quimiocines. Com a anticossos secundaris es va usar un còctel d'anticossos anti-citocines conjugats amb biotina, aplicant-hi després estreptavidina conjugada amb peroxidasa i posteriorment un reactiu de detecció. Les membranes es van revelar mitjançant quimioluminiscència en plaques autoradiogràfiques (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) en un Kodak M35X-OMAT Processor. Les citocines i quimiocines de les mostres es van valorar mitjançant un mètode densitomètric amb el programa d'anàlisi QuantityOne 1-D (BioRad, Hercules, CA, EEUU), obtenint un índex d'expressió per a cadascuna després de normalitzar-les respecte els controls. L'assaig es va fer per triplicat amb extractes proteics provinents de tres pools d'animals diferents per cada condició.

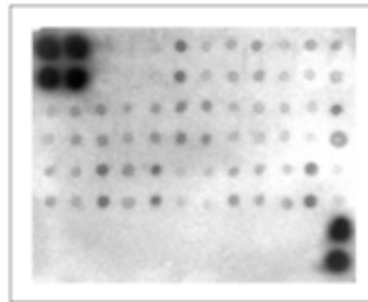


Figura 12. Array de proteïnes de baixa densitat incubat amb un extracte proteic pancreàtic de ratolins NOD RIP-IFN β diabètics

7. HIBRIDACIÓ *IN SITU* FLUORESCENT (FISH) : DETECCIÓ DE MMc

Per la detecció de MMc en teixit es va aplicar la metodologia de FISH en mostres de pàncrees d'hostes masculins amb sondes específiques pels cromosomes X i Y per tal de distingir les cèl.lules pròpies (XY) de les d'origen matern (XX). Aquest protocol es va realitzar durant una curta estada al Diabetes and Metabolism Department del Southmead Hospital, Universitat de Bristol, Regne Unit.

7.1. FISH

Es van utilitzar crioseccions de teixit pancreàtic de 4 µm de gruix. Per augmentar-ne l'adherència als portaobjectes, aquests havien estat prèviament tractats amb poli-L-lisina (1mg/ml) (Sigma-Aldrich) durant 15 min, rentant-los posteriorment amb aigua destil.lada i deixant-los assecar a l'aire. Les mostres van ser conservades a -70°C i assecades a l'aire durant 30 min abans de procedir amb la tècnica de FISH. Tot seguit, van ser rehidratades submergint-les 2 min en etanols 100%, 85% i 70% consecutivament. Després van fer tres rentats de 2 min

en aigua milliQ en agitació. Es van fixar les mostres en una solució de formaldehid a l'1% durant 5 min. Es van fer tres rentats de 2 min en aigua milliQ en agitació. Tot seguit es van deshidratar les mostres submergint-les en etanol 70%, 85% i 100% (2 min) i es van deixar assecar durant 5 min. Es van aplicar sondes d'hibridació específiques per DNA satèl·lit dels cromosomes X i Y (Vysis Probes CEP® Spectrum Orange™/ Spectrum Green™ direct labelled fluorescent, DNA probe kit, Abbott-Vysis, Downers Grove, IL, EEUU) barrejades amb tampó d'hibridació (Vysis) a una proporció 1:1 (5 µl per secció), cobrint-les amb un cobreobjectes i segellant els pous amb goma segelladora. Posteriorment es van desnaturalitzar les mostres durant 10 min a 73°C. Es van deixar les sondes hibridant a 42°C en una cambra humida durant 16 h. Es va fer un primer rentat en solució salina tamponada amb citrat sòdic (SSC) 0,4x SSC a 73°C agitant durant 1-3 s i rentant 1 min. Tot seguit es va repetir la operació. Es va fer un segon rentat a temperatura ambient submergint els portaobjectes en una solució de SSC 2x/0,1%Tween-20 a pH 7,2 durant 30 seg en agitació 30 s més sense agitar. Es van deshidratar les mostres submergint-les de nou en etanol al 70%, 85% i 100% durant 1 min a la foscor. Es van deixar assecar les mostres a temperatura ambient i s'hi va afegir una gota de medi de muntatge amb diclorhidrat de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) per contrastar els nuclis cel·lulars (Vectashield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EEUU). Finalment, es van cobrir les mostres amb el cobreobjectes i es van segellar.

Per detectar les cèl·lules d'origen matern es van analitzar les mostres mitjançant la observació en un microscopi de fluorescència Olympus BX41 (Olympus, Southend-on-Sea, Regne Unit) i el programa d'anàlisi d'imatge Isis (Metasystems, Altusheim, Alemanya). Es va analitzar la presència dels senyals corresponents a les sondes dels cromosomes X i Y en els nuclis cel·lulars contrastats amb DAPI, com s'observa a la **Figura 13**:

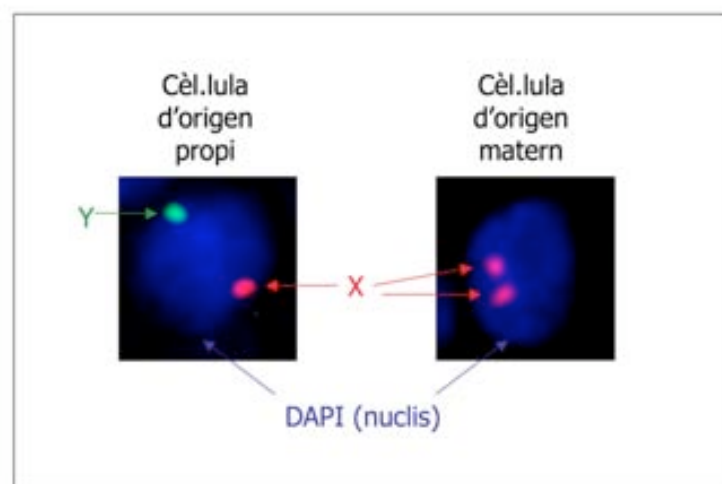


Figura 13. Nuclis pancreàtics marcats amb sondes FISH pels cromosomes X i Y. Nuclis de cèl·lules pancreàtiques de mostres d'home contrastats amb DAPI (blau). En la cèl·lula d'origen propi s'observa un senyal vermell corresponent a la sonda del cromosoma X (marcada amb Cy3) i un senyal verd corresponent a la sonda del cromosoma Y (marcada amb FITC). En el nucli d'origen matern s'observen dos senyals vermells corresponents als dos cromosomes X.

En cada secció de pàncrees de mostres d'homes es van poder distingir les cèl.lules XX, pressumiblement maternes, (amb dos senyals vermells) de les del propi individu (XY) (amb un senyal verd i un senyal vermell). La freqüència de cèl.lules maternes es va calcular com a percentatge de cèl.lules XX respecte el total de cèl.lules comptades. Es van tenir en compte les cèl.lules amb doble senyal i també les cèl.lules amb un sol senyal visible o cap per calcular l'eficiència de la tècnica: el percentatge de nuclis amb doble senyal respecte el total de nuclis. Es van comptar tots els nuclis no solapats presents en tots els camps d'una secció, capturant inicialment imatges amb l'objectiu de 40x i confirmant cada possible cèl.lula amb dos cromosomes X amb l'objectiu de 100x. Es van considerar cèl.lules maternes les cèl.lules amb dos senyals X separats (descartant així que fós un sol senyal partit en dos fragments), en nuclis ben definits i no solapats. Les possibles cèl.lules maternes es van determinar com a positives o negatives segons el criteri de 3-4 individus diferents.

7.2. FISH I IFL CONCOMITANTS

Per detectar cèl.lules maternes en la població de cèl.lules β (hostes masculins) es van aplicar les tècniques de FISH i IFL indirecta a la mateixa mostra. Es van fixar les mostres en una solució de formaldehid 1% durant 5 min a temperatura ambient. Per poder aplicar la IFL concomitant es va fer un pas addicional de recuperació d'antigen amb un tampó citrat. Aquesta tècnica permet el trencament d'entrecreuaments que es puguin haver format durant la fixació, permetent així que alguns epítops antigènics quedin més exposats. La recuperació d'antigen es va dur a terme submergint les mostres fixades en un tampó citrat (citrat trisòdic ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 10mM amb un 0,05% de Tween-20, pH 6,0) durant 4 min en un forn microones a una potència de 900W. Es van deixar refredar les mostres en el mateix tampó citrat durant 20 min a temperatura ambient. Posteriorment es van fer dos rentats de 3 min en solució de rentat PBS amb 0,1% de Tween-20 i es van deshidratar les mostres submergint-les en etanol al 70%, 85% i 100% (2 min).

A continuació es va seguir amb el protocol de FISH (punt 7.1). Després es va procedir amb la IFL, fent primer de tot un pas de bloqueig amb sèrum normal de cabra diluït al 0,5% en PBS, solució que també es va utilitzar com a tampó de dilució dels anticossos. Es van incubar les mostres amb un anticòs conill d'índies anti-insulina (Dako) diluït 1:800 durant 4 h a 37°C. Posteriorment es van fer dos rentats de 5 min en PBS-Tween-20 0,9% en agitació a temperatura ambient. Tot seguit es va aplicar l'anticòs secundari, cabra anti-conill d'índies marcat amb FITC (Vector Laboratories) diluït 1/200, incubant-lo durant 2 h a 37°C. Es van fer dos rentats més de 5 min en PBS amb 0,9% de Tween-20 en agitació a temperatura ambient. Es van deshidratar les mostres en etanol 70%, 85% i 100%, 1 min en cadascun, a temperatura ambient i a la foscor. Es van deixar assecar els portes a l'aire i es van muntar amb medi de muntatge amb DAPI (Vectashield) per contrastar els nuclis cel.lulars. Es van cobrir les mostres amb el cobreobjectes i es van segellar amb esmalt d'angles.

7. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística dels resultats es va realitzar mitjançant el programa GraphPad Prism (GraphPad *software*, San Diego, CA, EEUU). Es va utilitzar el test t-Student en els casos en que les dades s'ajustaven a una distribució normal i les variàncies no eren estadísticament diferents i el test de Mann-Whitney en els casos en que no es podia assumir normalitat. Per les comparacions de més de dos grups es va aplicar el test de múltiples comparacions de Turkey. En les comparacions d'un pacient respecte un grup d'individus de la població es va aplicar la variant del test t-Student per a una sola mostra, en la que es compara la mitjana de les dades dels controls (població) amb un valor hipotètic (Cas 1 o 4). L'anàlisi estadística dels resultats obtinguts mitjançant *microarrays* d'oligonucleòtids d'alta densitat es detalla de forma específica en el punt 4.2.2.

RESULTATS

RESULTATS

1. PERFILS D'EXPRESSIÓ DEL PÀNCREES I ELS ILLOTS EN PACIENTS AMB DT1

1.1. FENOTIPAT DE LA INSULITIS

Es va analitzar la composició de la insulitis dels quatre casos de pacients amb DT1 caracteritzats, mitjançant immunohistologia. Es va realitzar un recompte de cèl.lules positives pels següents marcadors leucocitaris: CD3, CD4 i CD8 (limfòcits T), CD19 (limfòcits B), CD68 (majoritàriament macròfags) i CD209 –DC-SIGN- (majoritàriament DCs convencionals). En cada cas es van analitzar uns 50-100 illots, pertanyents a cinc àrees de diferents zones de pàncrees. La seva caracterització fenotípica de l'infiltrat leucocitari es resumeix a la **Taula 10**.

Taula 10. Fenotipat de la insulitis dels 4 casos de pacients amb DT1

Cas	CD3 ⁺		CD4 ⁺		CD8 ⁺		CD19 ⁺		CD68 ⁺		CD209 ⁺	
	Illots positius	Cèl.lules/illot	Illots positius	Cèl.lules/illot	Illots positius	Cèl.lules/illot	Illots positius	Cèl.lules/illot	Illots positius	Cèl.lules/illot	Illots positius	Cèl.lules/illot
1	100%	12.17±2.89	69%	1.69±0.51	93%	9.28±2.81	71%	1.66±0.35	100%	6.85±1.16	24%	0.41±0.19
2	91%	8.06±0.89	74%	2.95±0.95	95%	4.93±0.73	79%	2.88±0.47	98%	4.66±0.55	27%	0.39±0.10
3	81%	2.09±0.19	57%	1.31±0.27	91%	2.04±0.27	80%	2.47±0.32	82%	3.06±0.48	28%	0.38±0.07
4	91%	4.09±0.93	28%	0.64±0.16	63%	1.44±0.31	76%	1.68±0.25	100%	4.11±0.99	67%	1.00±0.26

Les cèl.lules/illot s'expressen com a *mitjana±EEM* (error estàndard de la mitjana)

Com a poblacions leucocitàries predominants es van detectar els limfòcits T CD3⁺ i les cèl.lules CD68⁺ (marcador principalment de macròfags però expressat també en cèl.lules dendrítiques). Pel que fa als limfòcits T, es va observar una predominància de limfòcits T CD8⁺ respecte els T CD4⁺. Els limfòcits T CD4⁺, limfòcits B CD19⁺ i cèl.lules DC-SIGN⁺ també es van detectar formant part de la insulitis/peri-insulitis, tot i que en quantitats més moderades. La quantitat de limfòcits T CD8⁺ va resultar major en els casos d'inici (1 i 2) que en els casos de llarga evolució (3 i 4), sent les diferències significatives entre els casos 1 i 4 ($p<0,05$). En el Cas 1 es va observar una quantitat de limfòcits T CD3⁺ significativament major en comparació amb el Cas 2 ($p<0,05$) i amb els casos 3 i 4 ($p<0,001$). Entre els casos 2 i 3 també es van observar diferències significatives ($p<0,001$). Les poblacions de leucòcits CD68⁺, CD4⁺ i CD19⁺ i En conjunt, els quatre casos analitzats en aquest estudi presenten un fenotip de les cèl.lules leucocitàries infiltrants que es correspon amb el de la majoria de casos descrits fins al moment en pacients amb DT1.

A la **Figura 14** es mostren illots representatius en cada cas:

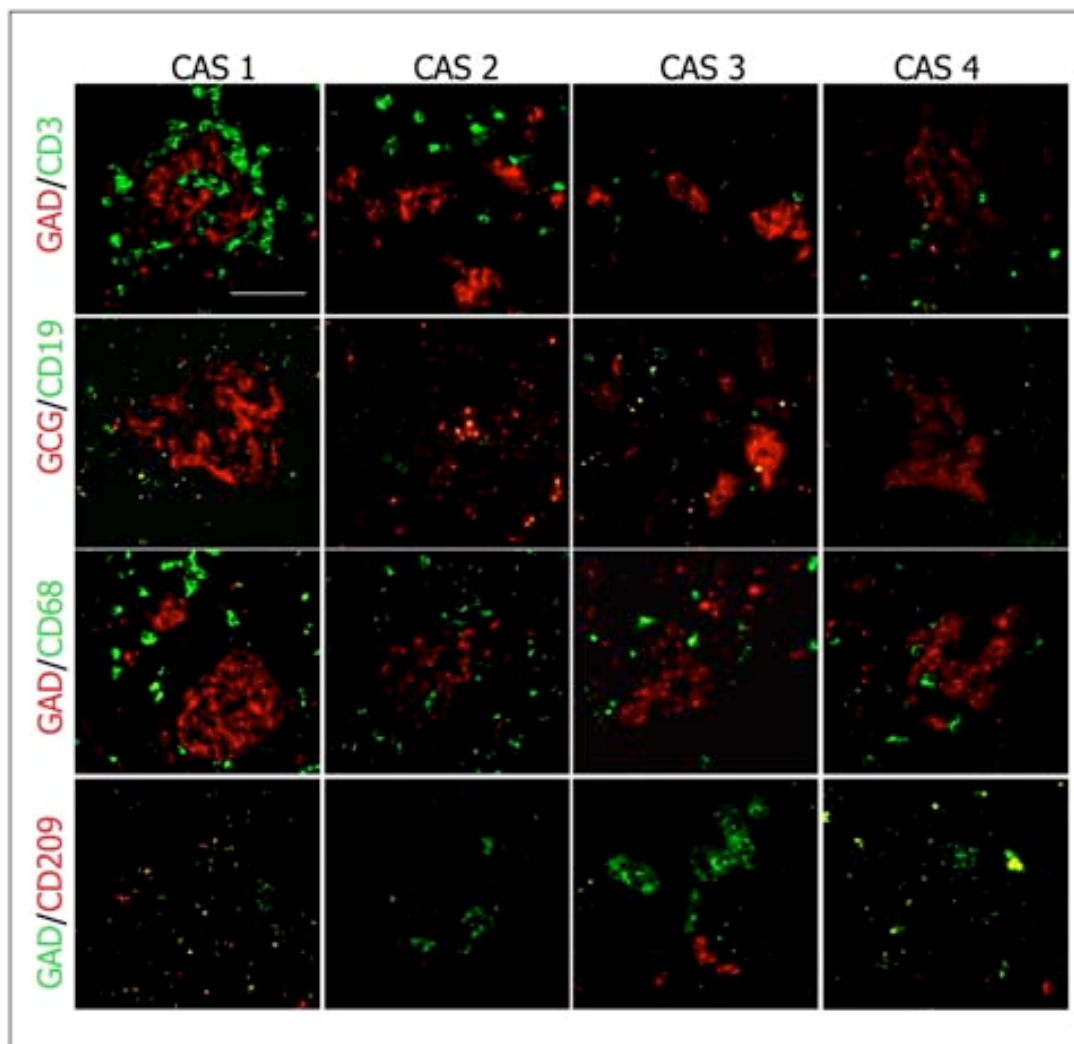


Figura 14. Caracterització immunohistològica de la insulinitis. Imatges corresponents a tincions mitjançant doble immunofluorescència indirecta de marcadors leucocitaris (CD3, CD19, CD68, CD209) en illots dels quatre casos de DT1 analitzats. Com a marcadors específics d'illot es van utilitzar GAD i glucagó. Magnificació: 200x. La barra horitzontal correspon a 100 µm.

1.2. TRANSCRIPTOMA DEL PÀNCREES I DELS ILLOTS

1.2.1 Gens amb expressió diferencial

Per determinar els gens expressats diferencialment en pàncrees total, es va comparar l'expressió gènica de la mitjana de tres blocs de pàncrees de cadascun dels quatre casos de DT1 amb la mitjana de tres blocs corresponents a tres controls (donants d'òrgans). En el cas del perfil dels illots purificats, les dues mostres dels casos 1 i 4 es van comparar amb la mitjana de tres mostres de tres controls. Les dades crues resultants de les hibridacions es van dipositar al repositori de dades *ArrayExpress* de l'*European Bioinformatics Institute* (www.ebi.ac.uk/arrayexpress), i corresponen a l'experiment amb codi d'accés E-MEXP-1140. El criteri utilitzat per definir l'expressió diferencial significativa va ser el valor de $p \leq 0,05$, coincidint amb un valor de p ajustat $\leq 0,26$ (ajustat segons el FDR). En el cas dels gens sobreexpressats,

els trànscrips amb un valor $p \leq 0,05$ van mostrar un logaritme del *fold change* (\log_2FC) $\geq 0,8$ i un $\log_2FC \geq -1,46$ en els gens amb una expressió significativament disminuïda. A la **Taula 11** es resumeix el nombre de gens expressats diferencialment en cada cas i de forma comuna.

Taula 11. Gens expressats diferencialment al pàncrees i als illots de quatre pacients amb DT1

	<i>Pàncrees</i>					<i>Illots purificats</i>			<i>Pàncrees i illots</i>
	<i>Cas 1</i>	<i>Cas 2</i>	<i>Cas 3</i>	<i>Cas 4</i>	<i>comuns</i>	<i>Cas 1</i>	<i>Cas 4</i>	<i>comuns</i>	<i>comuns</i>
Gens expressats diferencialment	851	1058	1444	635	149	902	975	423	4
Expressió augmentada	779 (92%)	1003 (95%)	1157 (80%)	613 (97%)	146	322 (36%)	178 (18%)	65	2
Expressió disminuïda	72 (8%)	55 (5%)	287 (20%)	22 (3%)	3	580 (64%)	797 (82%)	358	2

Tal com s'observa a la taula anterior, la majoria de gens expressats diferencialment en pàncrees total en pacients amb DT1 es troben sobreexpressats, al contrari del que s'observa en illots purificats, on la majoria dels trànscrips alterats mostren una expressió significativament reduïda. Aquesta discrepància es reflexa a la **Figura 15**. Una fracció dels gens sobreexpressats es manté en tots els casos, essent la majoria pel que fa als gens amb expressió disminuïda als illots (reflexant la destrucció insular) però proporcions més baixes pel que fa als gens sobreexpressats. Aquest fet reflexa diferències individuals. Només quatre gens es troben diferencialment expressats en tots quatre casos tant en pàncrees com en illots.

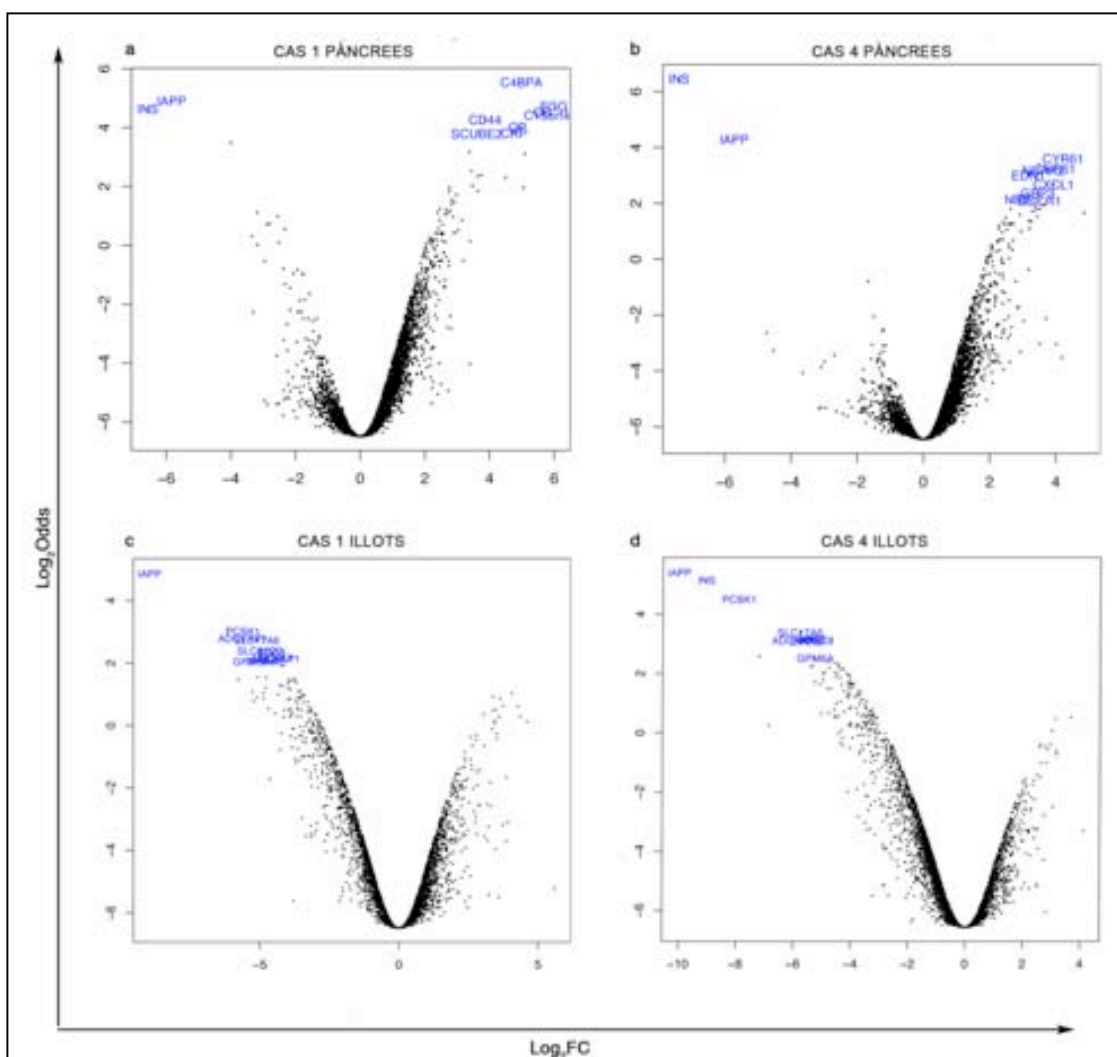


Figura 15. Gràfics volcà representant els gens diferencialment expressats en pàncrees i illots de pacients amb DT1. A l'eix d'abscisses es representa el grau d'expressió diferencial expressat en \log_2FC . A l'eix d'ordenades es representa en escala logarítmica el valor de la probabilitat que cada gen es trobi diferencialment expressat. Els gens sobreexpressats s'observen a la meitat dreta del volcà (valors positius) i els d'expressió disminuïda s'observen com a valors negatius. Els gràfics **a** i **b** corresponen al perfil d'expressió de pàncrees total dels casos 1 i 4 respectivament. En tots ells s'observa una predominància de gens sobreexpressats. Els gràfics **c** i **d** corresponen als perfils d'expressió dels illots purificats dels casos 1 i 4 respectivament, on s'hi observa, en canvi, una preponderància de gens d'expressió disminuïda.

1.2.2. Anotació funcional dels gens diferencialment expressats

Per definir processos alterats a l'òrgan diana en la DT1 en els quatre casos de DT1 es va determinar l'anotació funcional de tots els gens diferencialment expressats ($p < 0,05$) en cada cas.

Es va recopilar informació de cada gen utilitzant bases de dades de genòmica i expressió gènica i aplicacions bioinformàtiques (*Gene Expression Omnibus*, *ArrayExpress*, *SymAtlas*, *Entrez Gene*, *GeneCards*) i es va generar una base de dades amb informació rellevant per la immunologia de la DT1. A través d'aquesta informació es van classificar els gens diferencialment expressats en categories funcionals. A la **Figura 16** es mostra una representació de les 15 categories més enriquides en cada cas (**a**). En pàncrees total, destaca

un augment del nombre de gens relacionats amb el sistema immunitari, la senyalització, la regulació de la transcripció, el citoesquelet, la proteòlisi, desenvolupament i diferenciació, etc. En illots pancreàtics purificats, s'observa una preponderància de trànscripats disminuïts d'aquestes categories funcionals. Es mostra també una subclassificació dels gens del sistema immunitari (b), categoria funcional més sobrerrepresentada en quant a nombre de gens.

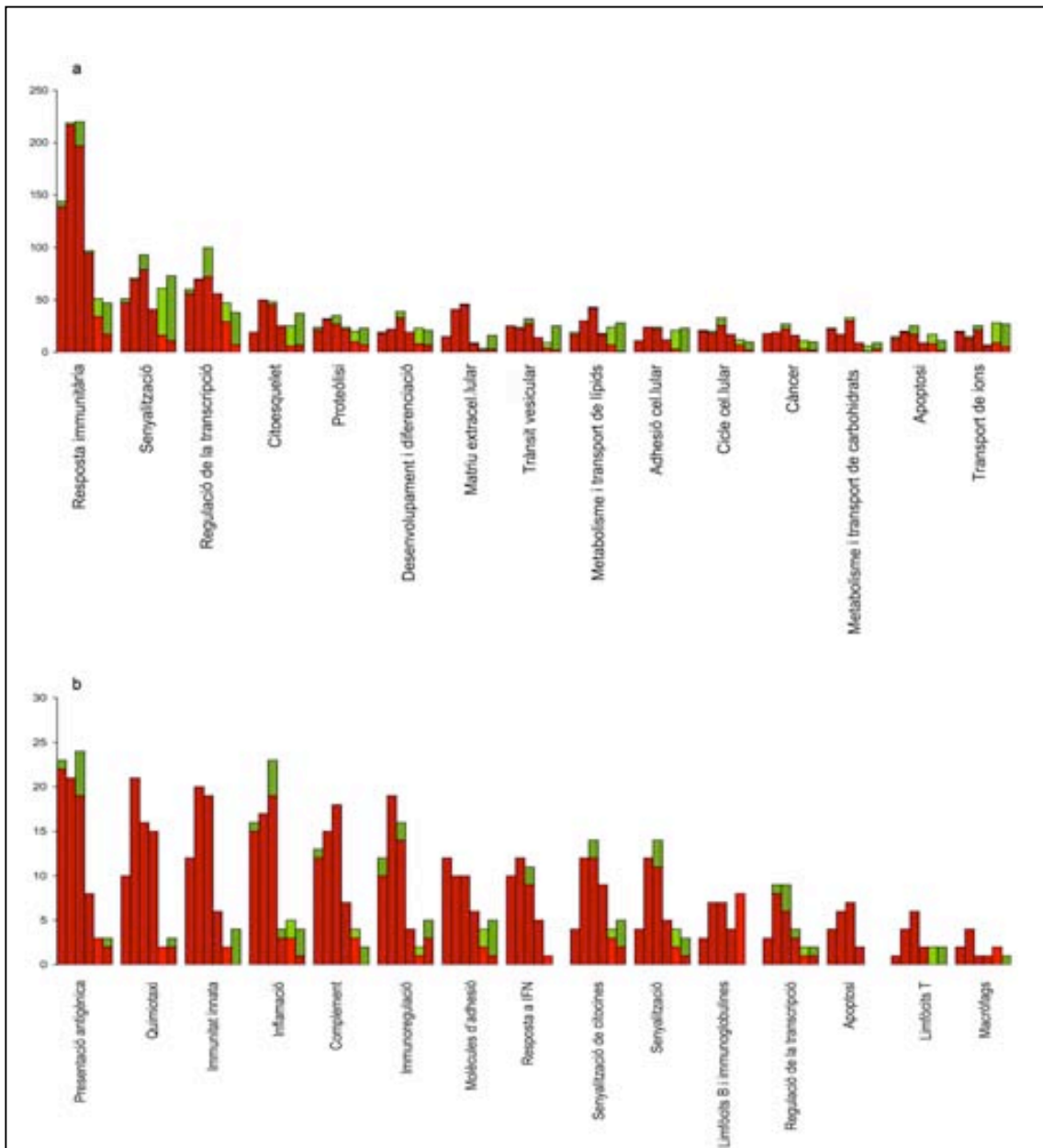


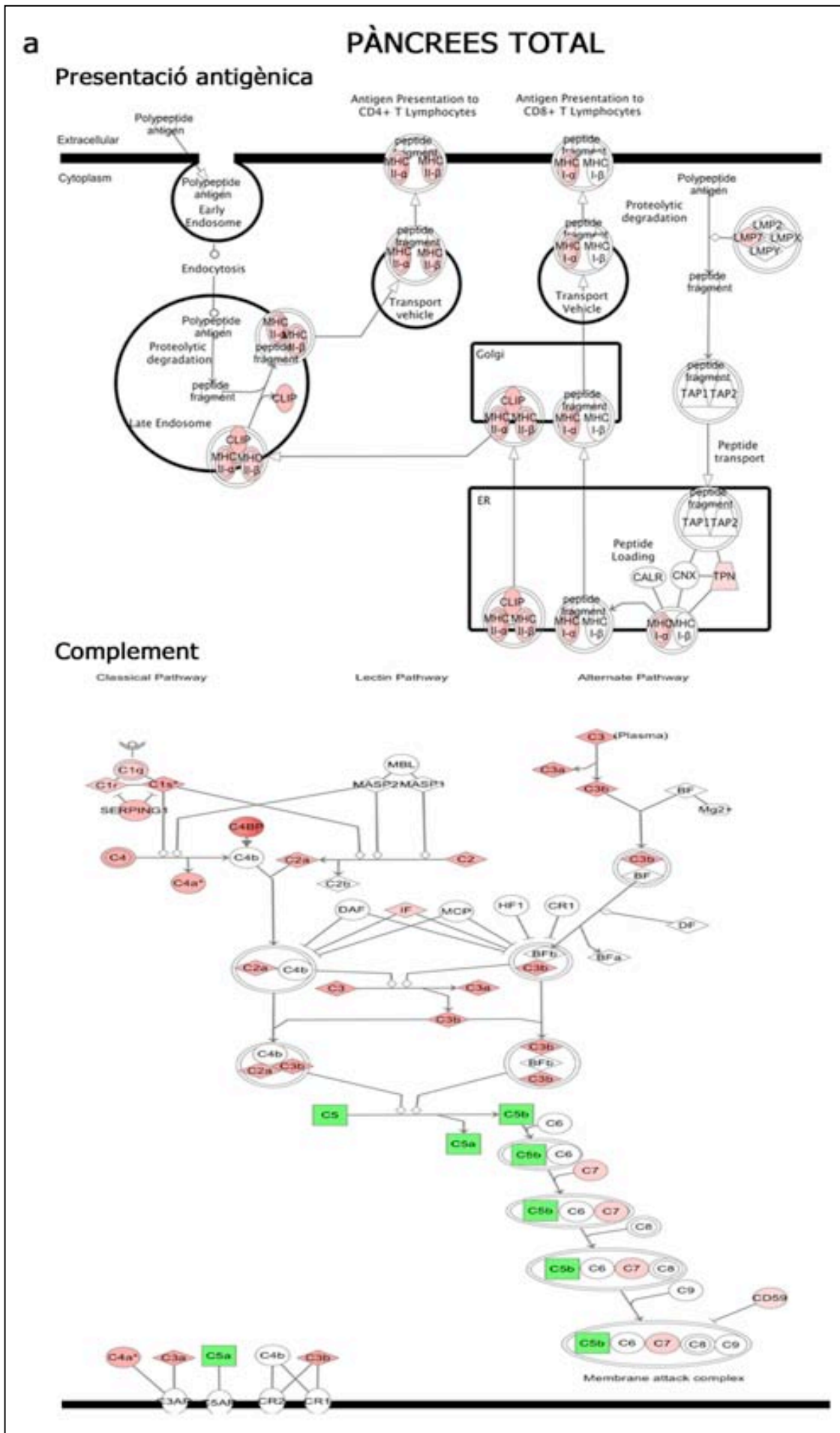
Figura 16. Distribució funcional dels gens diferencialment expressats en pàncrees i illots de pacients amb DT1. a) distribució funcional dels gens diferencialment expressats. Els gens del sistema immunitari, funció amb major nombre de gens diferencialment expressats, es mostren subclassificats (b)). En cada cas es mostren les 15 categories funcionals més representades i s'indica el número de gens de cadascuna. Per a les diferents funcions, cada barra representa una mostra, d'esquerra a dreta: Pàncrees Cas 1, pàncrees Cas 2, pàncrees Cas 3, pàncrees Cas 4, illots Cas 1 i illots Cas 4. Cada barra està dividida en dues fraccions corresponents al nombre de gens amb una expressió significativament augmentada (vermell) i reduïda (verd).

Per validar aquesta classificació, es van analitzar els gens amb expressió diferencial en mostres de pacients amb DT1 ($p < 0,05$) mitjançant el programa bioinformàtic Ingenuity Pathway Analysis (IPA), determinant les vies de senyalització canòniques alterades. A la **Taula 12** es mostren les 10 vies amb major significació estadística per cada cas.

Taula 12. Vies de senyalització canòniques de la base de dades IPA significativament més representades entre els gens diferencialment expressats. Es mostren les 10 vies amb major grau de significació per cada cas analitzat.

CAS	VIES DE SENYALITZACIÓ CANÒNIQUES DE LA BASE DE DADES DEL PROGRAMA INGENUITY (VALOR DE P)
Pàncrees Cas 1	Via de presentació d'antigen (6,31E-14) Sistema del complement (3,98E-12) Senyalització del rebuig a l'al.l'oempelt (1,41E-06) Senyalització de la malaltia autoimmunitària de la tiroide (2,57E-06) Senyalització de la resposta de fase aguda (7,41E-06) Senyalització de la malaltia de l'empelt contra l'hoste (7,41E-06) Metabolisme del glutatí (3,98E-05) Metabolisme de xenobiòtics a través del citocrom P450 (0,0001) Senyalització del lupus eritematos sistèmic (0,0003) Sistema de coagulació (0,0004)
Pàncrees Cas 2	Via de presentació d'antigen (2,00E-15) Sistema del complement (3,98E-12) Fibrosi hepàtica/Activació de cèl.lules estelades hepàtiques (3,16E-11) Maduració de cèl.lules dendrítiques (5,89E-08) Senyalització de la resposta de fase aguda (8,32E-08) Senyalització de la diabetis tipus 1 (3,72E-06) Senyalització de l'endocitosi mediada per caveoles (4,79E-06) Senyalització del rebuig a l'al.l'oempelt (7,41E-06) Senyalització de la malaltia autoimmunitària de la tiroide (1,32E-05) Senyalització de NF- κ B (1,55E-05)
Pàncrees Cas 3	Sistema del complement (1,26E-12) Via de presentació d'antigen (6,31E-12) Fibrosi hepàtica/Activació de cèl.lules estelades hepàtiques (1,10E-07) Senyalització de la resposta de fase aguda (2,45E-05) Senyalització de l'extravasació leucocitària (3,16E-05) Paper de NFAT en la regulació de la resposta immunitària (7,41E-05) Senyalització del rebuig a l'al.l'oempelt (8,51E-05) Maduració de cèl.lules dendrítiques (0,0001) Senyalització de la malaltia autoimmunitària de la tiroide (0,0001) Resposta d'estrès oxidatiu mediada per NRF2 (0,0002)
Pàncrees Cas 4	Fibrosi hepàtica/Activació de cèl.lules estelades hepàtiques (5,25E-05) Senyalització del receptor de glucocorticoids (0,0006) Regulació de la resposta immunitària a través de MIF (0,0007) Senyalització de la resposta de fase aguda (0,0008) Senyalització de quimiocines (0,0008) Senyalització de p38 MAPK (0,0011) Senyalització de CCR5 en macròfags (0,0017) Senyalització de la hormona de creixement (0,0023) Senyalització d' IL-17 (0,0038) Senyalització d'HMGB1 (0,0044)
Illots Cas 1	Senyalització β -adrenèrgica cardíaca (6,03E-06) Senyalització de la diabetis MODY (<i>Maturity Onset Diabetes of Young</i>) (7,41E-05) NRF2-mediated Oxidative Stress Response (0,0004) cAMP-mediated Signaling (0,0004) Senyalització de CCR5 en macròfags (0,0008) Senyalització de CXCR4 (0,0011) Senyalització de relaxina (0,0012) Senyalització del factor d'alliberació de corticotropina (0,0013) Senyalització de proteïnes G mediada per Tubby (0,0013) Senyalització α -adrenèrgica (0,0029)
Illots Cas 4	Senyalització β -adrenèrgica cardíaca (1,07E-06) Senyalització de la orientació axonal (3,89E-06) Senyalització mediada per cAMP (3,98E-05) Senyalització de la diabetis MODY (<i>Maturity Onset Diabetes of Young</i>) (0,0001) Efectes cel.lulars de Sildenafil (0,0002) Potenciació sinàptica a llarg termini (0,0002) Senyalització de la melatonina (0,0002) Senyalització de receptors acoblats a proteïnes G (0,0002) Senyalització de CREB en neurones (0,0003) Senyalització de calci (0,0003)

L'anàlisi mitjançant el programa IPA van confirmar l'alteració de gens del sistema immunitari, estrès oxidatiu, remodelació tissular i senyalització en pàncrees total de pacients amb DT1 i de vies del sistema nerviós, endocrí i de senyalització en illots purificats. Com a exemple, a la **Figura 17** es representen dues de les vies de senyalització més significativament alterades en en Cas 1 en pàncrees (**a**, presentació antigènica, complement) i en illots purificats (**b**, senyalització β -adrenèrgica cardíaca, senyalització de la diabetis MODY o diabetis de l'adult d'inici juvenil). En base a l'anotació funcional observada es va centrar l'anàlisi principalment en gens del sistemes immunitari i neuroendocrí.



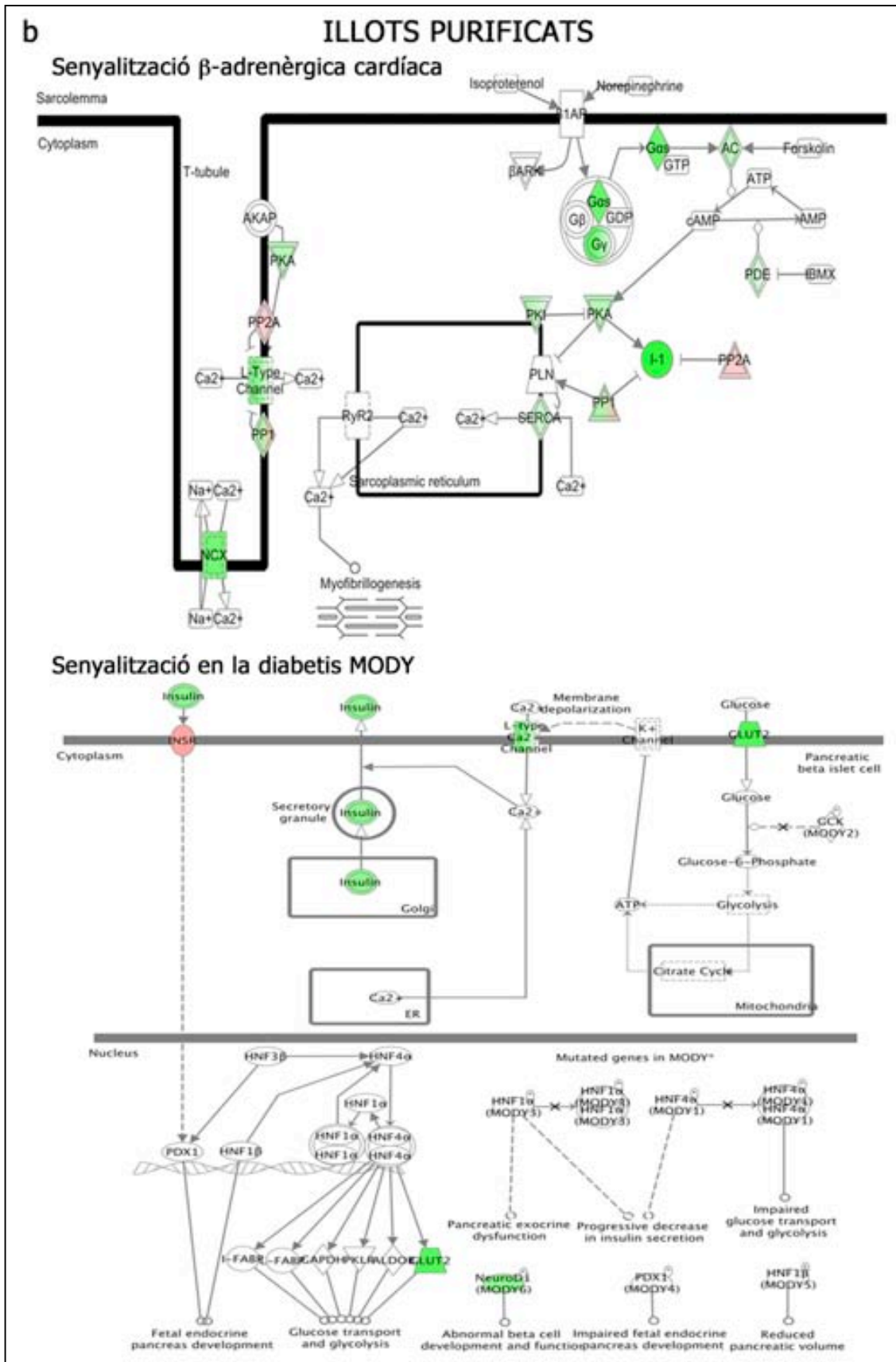


Figura 17. Vies canòniques de senyalització IPA (Ingenuity) significativament alterades. a, en pàncrees total (presentació antigènica i sistema del complement); **b**, en illots purificats (senyalització β -adrenèrgica cardíaca i senyalització de la diabetis MODY). En vermell es destaquen els gens sobreexpressats i en verd els d'expressió disminuïda corresponents al Cas 1.

1.2.3. Sobreexpressió de trànscrips del sistema immunitari

En pàncrees dels quatre casos analitzats es va observar un augment de trànscrips de funcions relacionades amb la resposta immunitària. Alguns trànscrips, com per exemple els dels marcadors leucocitaris CD45 (*PTPRC*) i *CD84*, reflecteixen la presència de la insulitis. En pàncrees total, 44 dels 149 gens (29%) que van mostrar variacions transcripcionals comunes a tots els casos pertanyen al sistema immunitari. En illots purificats, el percentatge de trànscrips diferencialment expressats comuns a les dues mostres i relacionats amb el sistema immunitari és només un 4,7% (20 de 423). Aquest augment de gens del sistema immunitari es representa en forma de *heatmap* a la **Figura 18**:

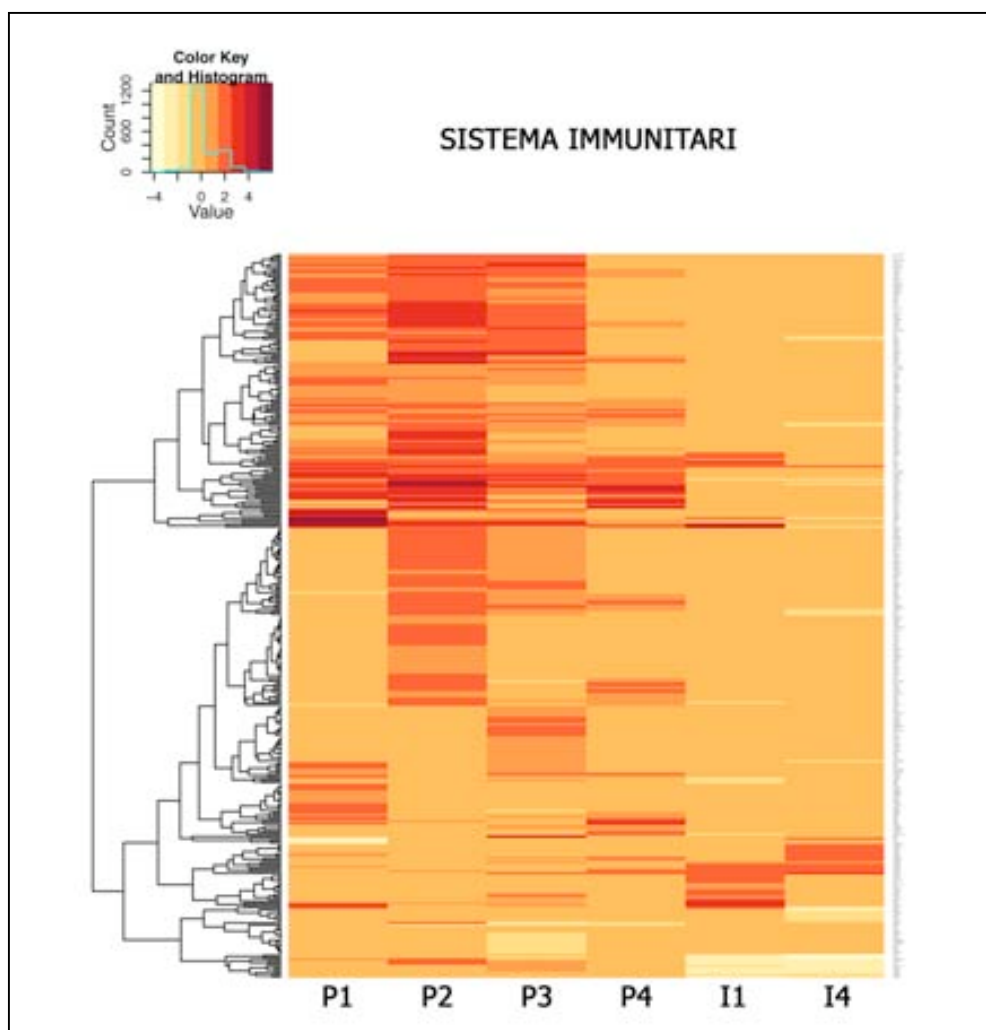
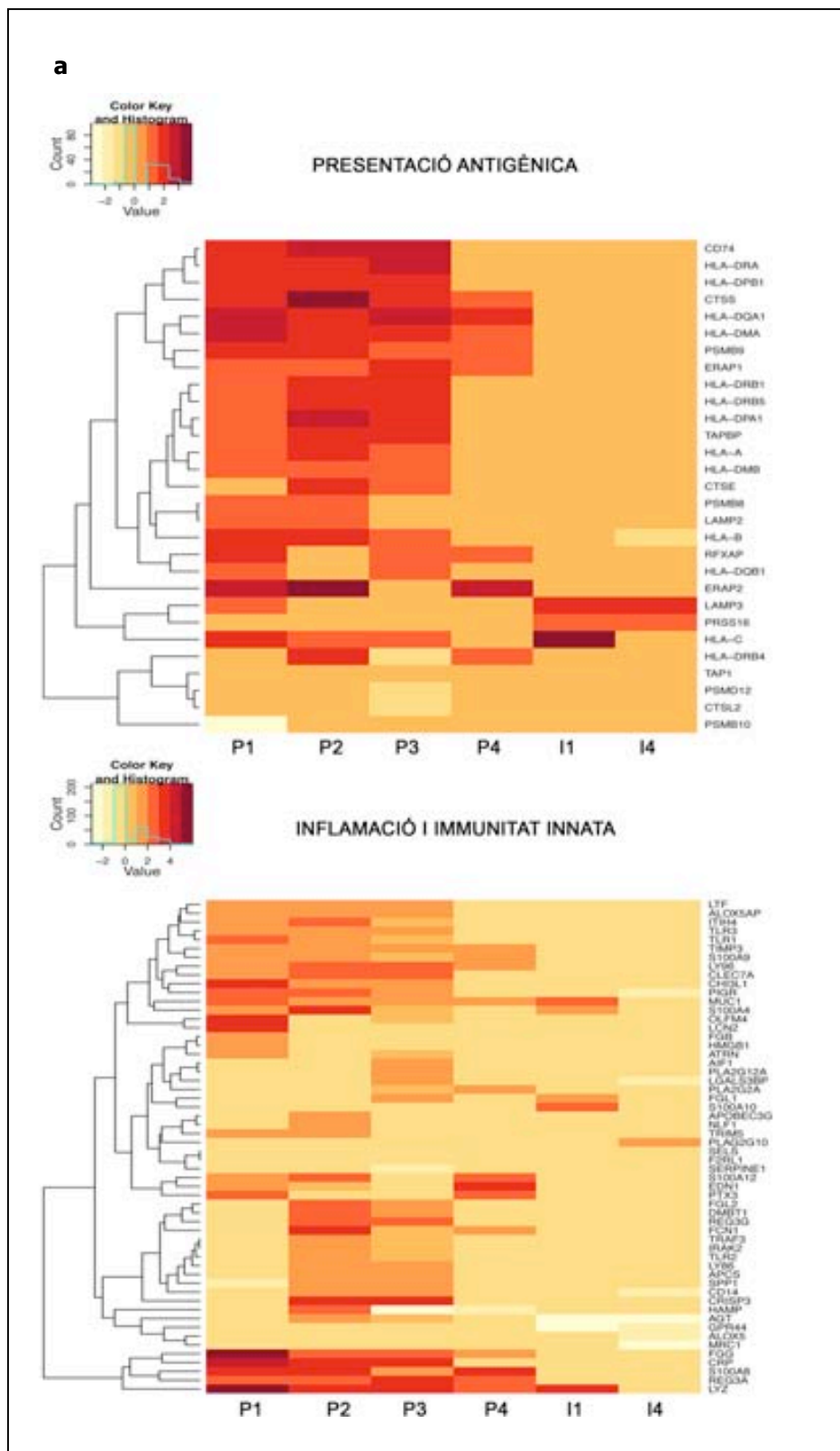
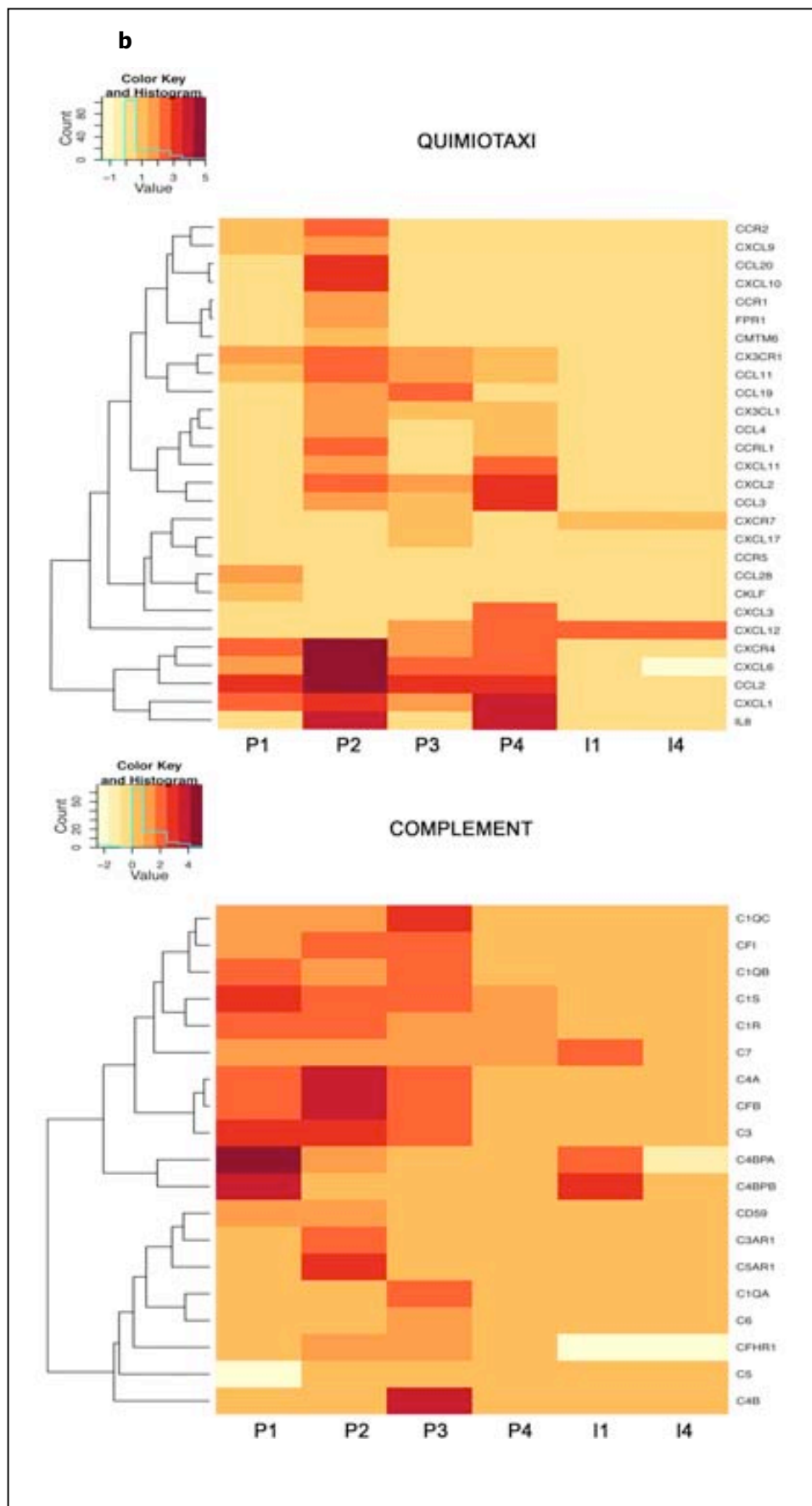


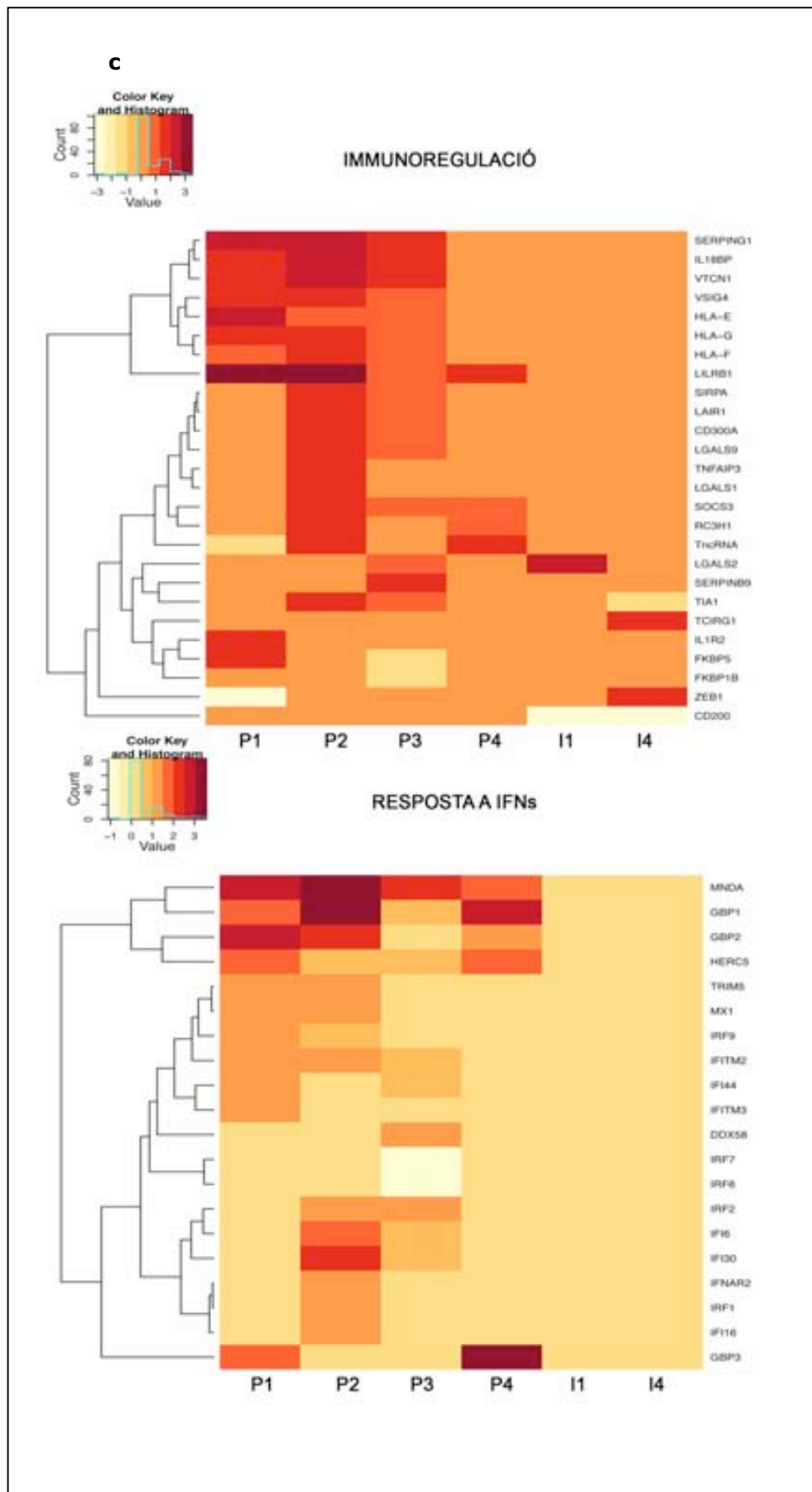
Figura 18. Representació en forma de *heatmap* del perfil d'expressió dels gens del sistema immunitari. Cada fila correspon a un gen i cada columna a un cas (P1: pàncrees del Cas 1, P2: pàncrees del Cas 2, P3: pàncrees del Cas 3, P4: pàncrees del Cas 4; I1: pàncrees del Cas 1, I4: pàncrees del Cas 4). Es mostren tots els gens del sistema immunitari amb variacions d'expressió significatives, agrupats de forma jeràrquica. Els valors d'expressió es mostren com a \log_2FC . El codi de colors corresponent al \log_2FC es mostra a l'extrem superior esquerre.

Dins del grup de gens del sistema immunitari, es van detectar perfils alterats de trànscrips de presentació antigènica, immunitat innata i inflamació, quimiotaxi, complement,

immunoregulació, resposta a IFNs, molècules d'adhesió i de subpoblacions leucocitàries. Els perfils d'expressió gènica d'aquestes categories es representen a la **Figura 19**:







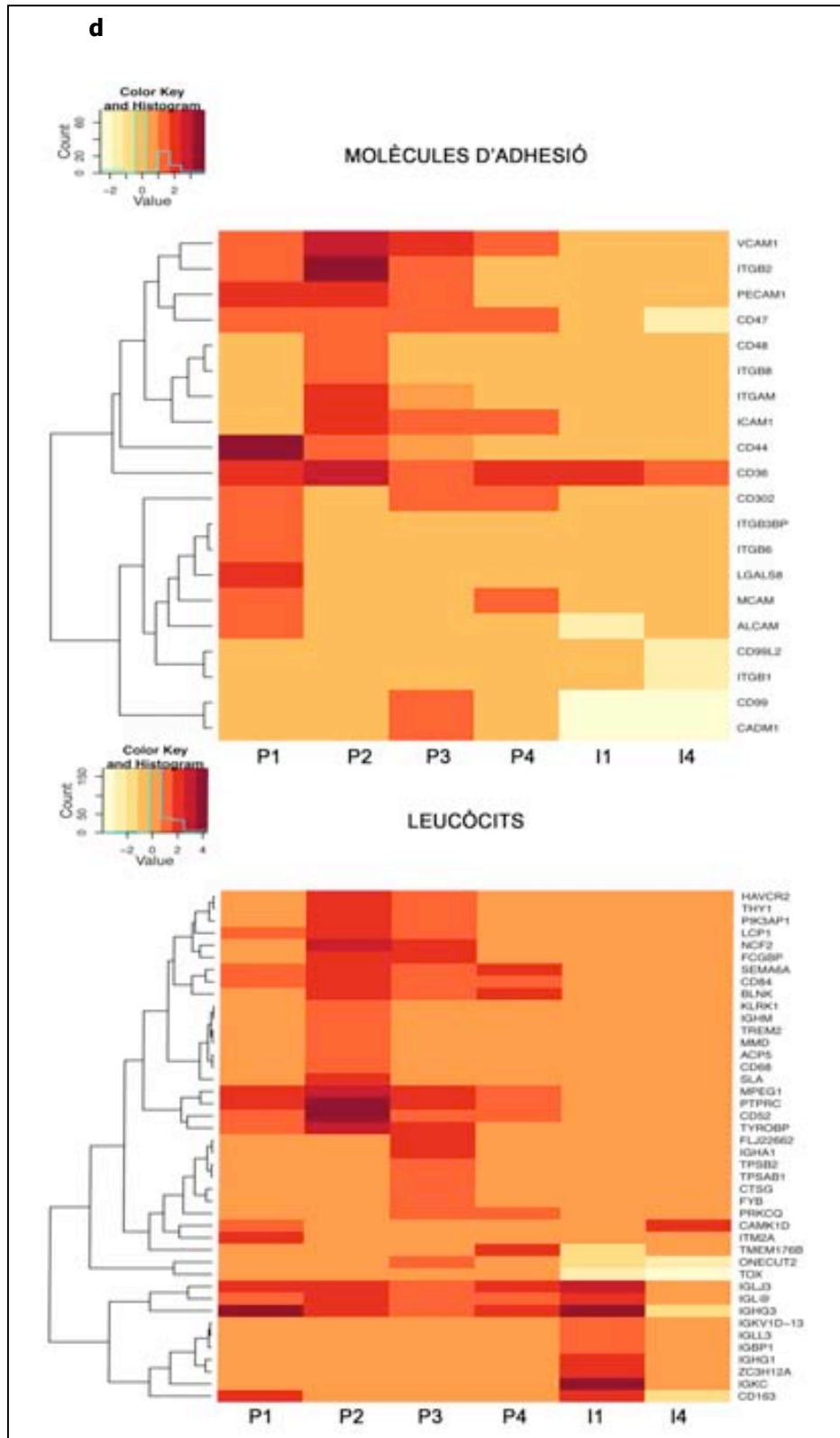


Figura 19. Representació en forma *heatmap* dels perfils d'expressió gènica de subcategories del sistema immunitari. a) presentació antigènica i inflamació i immunitat innata, b) quimiotaxi i complement, c) immunoregulació i resposta a IFNs i d) molècules d'adhesió i leucòcits. Cada fila correspon a un gen i cada columna a un cas (P1: pàncrees del Cas 1, P2: pàncrees del Cas 2, P3: pàncrees del Cas 3, P4: pàncrees del Cas 4; I1: pàncrees del Cas 1, I4: pàncrees del cas 4). Els valors d'expressió es mostren com a \log_2FC . El codi de colors segons el \log_2FC es mostra a l'extrem superior esquerre per cada *heatmap*.

Dins dels gens del sistema immunitari, es van detectar variacions transcripcionals en gens de diferents vies:

- **Presentació antigènica:** és la via funcional que va mostrar un major nombre de gens alterats. El perfil transcripcional de gens de presentació antigènica va mostrar una sobreexpressió de trànscrips en pàncrees total d'HLA de classe I (*HLA-A, B i C*), de classe II (*HLA-DP, DQ i DR, CD74 i HLA-DM*) i de peptidases implicades en el processament antigènic (*CTSS, ERAP1*). En el Cas 4 el nombre de trànscrips de presentació antigènica sobreexpressats va resultar menor, en el Cas 1 es va observar un augment d'expressió d'*HLA-C* i de la peptidasa *PRSS16* en els casos 1 i 4.
- **Inflamació i immunitat innata:** es van observar també alteracions en els casos de DT1 de forma predominant en pàncrees total respecte a illots. Va destacar un augment de l'expressió de gens de resposta inflamatòria i de fase aguda (*FGG, CRP, gens de família S100*), de receptors de la immunitat innata (TLRs 1, 2 i 3, *CD14*) i de factors antimicrobians (*LY96, REG3A, MUC1 i LYZ*).
- **Quimiotaxi:** es va detectar també una sobreexpressió de quimiocines en pàncrees total, de forma més prominent en els casos 2 i 4. Les quimiocines proinflamatòries *CCL2, CCL11, CXCL1* and *CXCL6* i els receptors *CX3CR1* i *CXCR4* van resultar sobreexpressats en tots els casos de DT1 en pàncrees total.
- **Complement:** la majoria de gens del sistema del complement van mostrar un augment d'expressió en pàncrees total en els casos 1, 2 i 3, incloent factors reguladors. En illots pancreàtics purificats dels casos 1 i 4 es va observar una reducció d'expressió del factor regulador *CFHR1*.
- **Immunoregulació:** Es van detectar variacions transcripcionals en gens amb funció immunoreguladora en pàncrees en els casos de DT1, com per exemple en els gens d'HLA no clàssic *HLA-E, F i G* en els casos 1, 2 i 3 i de la molècula *LILRB1*, lligand d'HLA amb funció inhibidora, en els tots quatre casos en pàncrees. La citocina immunosupressora i de remodelació tissular *TGFβ2* també es va observar sobreexpressada en pàncrees. En canvi, en illots purificats no es va detectar un perfil de sobreexpressió de gens d'immunoregulació.
- **Resposta a IFNs:** En el Cas 2 es va detectar un patró o *signature* de gens de resposta a IFNs -*GBP1, 2 i 3, MNDA, HERC5, IFNAR2, etc.*- alguns dels quals també es van observar sobreexpressats en els casos 1, 3 i 4 en pàncrees total. Mitjançant una anàlisi amb el programa IPA es va observar que les alteracions pertanyien tant a la via dels IFNs de tipus I com de tipus II. En illots pancreàtics purificats no es va detectar aquest patró de sobreexpressió de gens de resposta a IFNs.

- **Molècules d'adhesió:** Gens corresponents a molècules d'adhesió com *CD47*, *VCAM1* i *CD36* es van mostrar sobreexpressats en pàncrees total en els quatre casos de DT1. *CD36*, que a més de molècula d'adhesió és un receptor *scavenger*, també va resultar sobreexpressat en illots purificats dels casos de DT1, en els quals es va observar una expressió disminuïda d'altres molècules d'adhesió.
- **Leucòcits:** Es van observar gens de subpoblacions leucocitàries sobreexpressats als teixits diana dels casos analitzats. Alguns exemples són gens de marcadors leucocitaris de limfòcits T i cèl.lules NK (*KLRK1* o *NKG2D*, *TYROBP* o *DAP12*), limfòcits B, macròfags (*MPEG1*), DCs (*SEMA6A*), i neutròfils (*NCF2*). Aquestes alteracions es van detectar en pàncrees total de forma prominent, amb la clara excepció dels transcrits d'Igs, destacant en illots purificats del Cas 1 a més del pàncrees total en els 4 casos.

En conjunt, es va observar una sobreexpressió de gens d'inflamació, immunitat innata, immunitat adaptativa i immunoregulació al teixit diana de la DT1 en tots els quatre casos analitzats. Aquestes alteracions es van detectar de forma més marcada en els casos 1, 2 i 3 que en el Cas 4 (amb l'excepció de la quimiotaxi que sí es va trobar marcadament alterada en aquest cas). Aquest perfil de sobreexpressió de gens del sistema immunitari en els casos de DT1 es va observar en pàncrees total, però no en illots pancreàtics purificats on, amb l'excepció de les Igs, es va detectar sobreexpressió d'alguns gens de cada categoria però no tot un patró general d'alteració. A la **Taula 13** es mostra una recopilació de tots els gens del sistema immunitari expressats diferencialment en els casos de DT1. Una taula addicional amb el nom complet dels gens s'inclou com a material suplementari en format digital.

Taula 13. Gens del sistema immunitari expressats diferencialment en pàncrees i en illots de pacients amb DT1

Funció	Locus ID	Símbol	Log ₂ FC P1	Log ₂ FC P2	Log ₂ FC P3	Log ₂ FC P4	Log ₂ FC I1	Log ₂ FC I4	
Presentació antigènica	972	<i>CD74</i>	1,93	2,47	2,74	-	-	-	
	1510	<i>CTSE</i>	-	1,88	1,43	-	-	-	
	1515	<i>CTSL2</i>	-	-	-1,17	-	-	-	
	1520	<i>CTSS</i>	2,20	3,59	2,17	0,89	-	-	
	51752	<i>ERAP1</i>	1,34	1,23	1,91	1,37	-	-	
	64167	<i>ERAP2</i>	2,82	3,88	-0,54	2,72	-	-	
	3105	<i>HLA-A</i>	1,49	1,72	1,26	-	-	-	
	3106	<i>HLA-B</i>	1,68	1,66	1,43	-	-	-1,33	
	3107	<i>HLA-C</i>	1,79	1,31	1,21	-	3,46	-	
	3108	<i>HLA-DMA</i>	2,47	2,29	2,12	1,23	-	-	
	3109	<i>HLA-DMB</i>	1,39	1,26	1,47	-	-	-	
	3113	<i>HLA-DPA1</i>	1,17	2,38	1,91	-	-	-	
	3115	<i>HLA-DPB1</i>	1,72	2,22	2,08	-	-	-	
	3117	<i>HLA-DQA1</i>	2,58	1,77	2,50	1,85	-	-	
	3119	<i>HLA-DQB1</i>	1,30	-	1,07	-	-	-	
	3122	<i>HLA-DRA</i>	1,99	2,35	2,65	-	-	-	
	3123	<i>HLA-DRB1</i>	1,28	2,08	2,12	-	-	-	
	3126	<i>HLA-DRB4</i>	-	1,89	-1,29	1,08	-	-	
	3127	<i>HLA-DRB5</i>	1,19	1,65	2,26	-	-	-	
	3920	<i>LAMP2</i>	1,32	1,09	-	-	-	-	
	27074	<i>LAMP3</i>	1,41	-	-	-	1,8	1,66	
	10279	<i>PRSS16</i>	-	-	-	-	1,43	1,53	
	5699	<i>PSMB10</i>	-2,95	-	-	-	-	-	
	5696	<i>PSMB8</i>	1,38	1,09	-	-	-	-	
	5698	<i>PSMB9</i>	2,06	1,67	1,11	1,06	-	-	
	5718	<i>PSMD12</i>	-	-	-0,94	-	-	-	
	5994	<i>RFXAP</i>	1,81	-	1,22	1,27	-	-	
	6890	<i>TAP1</i>	-	-	-0,62	-	-	-	
	6892	<i>TAPBP</i>	1,11	2,24	1,61	-	-	-	
	Quimiotaxi	6356	<i>CCL11</i>	1,01	2,18	1,97	0,89	-	-
		6363	<i>CCL19</i>	-	2,04	2,10	-	-	-
		6347	<i>CCL2</i>	2,90	4,68	3,15	3,41	-	-
		6364	<i>CCL20</i>	-	3,12	-	-	-	-
		56477	<i>CCL28</i>	1,82	-	-	-	-	-
		6348	<i>CCL3</i>	-	1,99	0,89	3,19	-	-
		6351	<i>CCL4</i>	-	1,65	0,56	1,31	-	-
1230		<i>CCR1</i>	-	1,72	-	-	-	-	
1231		<i>CCR2</i>	1,36	2,74	-	-	-	-	
1234		<i>CCR5</i>	-	-	0,50	-	-	-	
51554		<i>CCRL1</i>	-	2,20	-	1,25	-	-	
51192		<i>CKLF</i>	1,14	-	-	-	-	-	
54918		<i>CMTM6</i>	-	1,20	-	-	-	-	
6376		<i>CX3CL1</i>	-	2,06	0,94	1,06	-	-	
1524		<i>CX3CR1</i>	1,51	2,11	1,98	1,35	-	-	
2919		<i>CXCL1</i>	2,14	3,02	1,57	3,94	-	-	
3627		<i>CXCL10</i>	-	2,95	-	-	-	-	
6373		<i>CXCL11</i>	-	1,64	-	2,11	-	-	
6387		<i>CXCL12</i>	-	-	1,86	2,19	2,1	2,81	
284340		<i>CXCL17</i>	-	-	1,21	-	-	-	
2920		<i>CXCL2</i>	-	2,63	1,82	2,87	-	-	
2921		<i>CXCL3</i>	-	-	-	2,25	-	-	
6372		<i>CXCL6</i>	2,06	5,00	2,11	2,00	-	-1,53	
4283		<i>CXCL9</i>	1,24	1,95	0,58	-	-	-	
7852		<i>CXCR4</i>	2,24	4,49	1,99	2,22	-	-	
57007		<i>CXCR7</i>	-	-	1,17	-	1,16	1,21	
2357		<i>FPR1</i>	-	1,62	-	-	-	-	
3576	<i>IL8</i>	-	3,87	-	4,01	-	-		

Taula 13 (continuació). Gens del sistema immunitari expressats diferencialment en pàncrees i en illots de pacients amb DT1

Funció	Locus ID	Símbol	Log ₂ FC P1	Log ₂ FC P2	Log ₂ FC P3	Log ₂ FC P4	Log ₂ FC I1	Log ₂ FC I4	
Immunitat innata	60489	<i>APOBEC3G</i>	-	1,43	-	-	-	-	
	929	<i>CD14</i>	-	1,95	1,09	-	-	-1,59	
	64581	<i>CLEC7A</i>	1,87	2,80	2,05	-	-	-	
	10321	<i>CRISP3</i>	-	3,93	3,32	-	-	-	
	1755	<i>DMBT1</i>	-	2,50	1,65	-	-	-	
	2219	<i>FCN1</i>	-	3,38	0,89	1,09	-	-	
	3656	<i>IRAK2</i>	-	1,68	0,63	-	-	-	
	3934	<i>LCN2</i>	3,39	-	-	-	-	-	
	3959	<i>LGALS3BP</i>	-	-	1,20	-	-	-1,19	
	4057	<i>LTF</i>	1,45	1,52	1,85	-	-	-	
	9450	<i>LY86</i>	-	1,56	1,09	-	-	-	
	23643	<i>LY96</i>	1,78	2,47	2,15	1,37	-	-	
	4069	<i>LYZ</i>	5,05	3,31	3,41	2,39	3,93	-	
	4582	<i>MUC1</i>	2,67	1,54	1,55	1,44	2,03	-	
	4360	<i>MRC1</i>	-	-	-	-	-	-2,43	
	5284	<i>PIGR</i>	2,40	2,22	1,90	-	-	-1,66	
	5806	<i>PTX3</i>	2,22	-	-	2,16	-	-	
	5068	<i>REG3A</i>	2,70	2,8	3,13	2,06	-	-	
	130120	<i>REG3G</i>	-	2,89	2,68	-	-	-	
	7096	<i>TLR1</i>	2,06	1,26	0,83	-	-	-	
	7097	<i>TLR2</i>	-	1,48	0,79	-	-	-	
	7098	<i>TLR3</i>	1,99	1,40	1,12	-	-	-	
	7187	<i>TRAF3</i>	-	1,66	0,66	-	-	-	
	85363	<i>TRIM5</i>	1,08	1,34	-	-	-	-	
	Inflamació	183	<i>AGT</i>	-	1,97	1,01	-	-2,44	-2,97
		199	<i>AIF1</i>	-	-	1,36	-	-	-
240		<i>ALOX5</i>	-	-	-	-	-	-1,55	
241		<i>ALOX5AP</i>	1,26	1,32	1,11	-	-	-	
325		<i>APCS</i>	-	1,28	1,49	-	-	-	
8455		<i>ATRN</i>	1,67	-	0,73	-	-	-	
1116		<i>CHI3L1</i>	3,15	1,69	1,73	-	-	-	
1401		<i>CRP</i>	4,76	3,23	3,50	-	-	-	
1906		<i>EDN1</i>	1,11	0,93	-	3,17	-	-	
2150		<i>F2RL1</i>	-	-	-0,88	-	-	-	
2244		<i>FGB</i>	1,46	-	-	-	-	-	
2266		<i>FGG</i>	5,99	2,20	2,29	1,17	-	-	
2267		<i>FGL1</i>	-	-	1,12	-	1,40	-	
10875		<i>FGL2</i>	-	2,19	1,99	-	-	-	
11251		<i>GPR44</i>	-	-	-	-	-2,01	-1,53	
57817		<i>HAMP</i>	-	2,02	-2,02	-1,81	-	-	
3146		<i>HMGB1</i>	1,27	-	-	-	-	-	
3700		<i>ITIH4</i>	1,18	2,20	0,89	-	-	-	
145741		<i>NLF1</i>	-	1,20	-	-	-	-	
10562		<i>OLFM4</i>	3,75	-	0,91	-	-	-	
81579		<i>PLA2G12A</i>	-	-	1,22	-	-	-	
5320		<i>PLA2G2A</i>	-	-	0,97	1,31	-	-	
8399		<i>PLAG2G10</i>	-	-	-	-	-	1,59	
6281		<i>S100A10</i>	-	-	-	-	2,31	-	
6283		<i>S100A12</i>	1,21	2,11	-	2,36	-	-	
6275		<i>S100A4</i>	1,48	3,49	1,00	-	1,51	-	
6279		<i>S100A8</i>	3,64	3,46	1,58	3,64	-	-	
6280		<i>S100A9</i>	1,36	1,83	0,64	1,15	-	-	
55829		<i>SELS</i>	-	-	-0,87	-	-	-	
5054		<i>SERPINE1</i>	-	-	-1,76	-	-	-	
6696		<i>SPP1</i>	-1,19	1,87	1,23	-	-	-	
7078		<i>TIMP3</i>	1,35	1,77	1,47	1,57	-	-	
Complement	712	<i>C1QA</i>	-	-	2,03	-	-	-	
	713	<i>C1QB</i>	1,74	0,94	2,16	-	-	-	
	714	<i>C1QC</i>	1,29	1,49	2,59	-	-	-	
	715	<i>C1R</i>	1,69	1,93	1,44	1,12	-	-	
	716	<i>C1S</i>	2,62	2,10	1,92	1,59	-	-	
	718	<i>C3</i>	2,69	3,02	2,29	-	-	-	
	719	<i>C3AR1</i>	-	1,66	-	-	-	-	
	720	<i>C4A</i>	2,32	3,53	2,38	-	-	-	
	721	<i>C4B</i>	-	-	4,00	-	-	-	
	722	<i>C4BPA</i>	4,96	1,05	0,60	-	2,26	-1,47	
	725	<i>C4BPB</i>	3,38	-	0,52	-	3,05	-	
	727	<i>C5</i>	-2,33	-	-	-	-	-	
	728	<i>C5AR1</i>	-	2,81	0,80	-	-	-	
	729	<i>C6</i>	-	-	0,86	-	-	-	
	730	<i>C7</i>	1,39	1,20	1,15	1,45	1,72	-	
	966	<i>CD59</i>	1,07	1,36	0,59	-	-	-	
	629	<i>CFB</i>	2,33	3,66	2,16	-	-	-	
	3078	<i>CFHR1</i>	-	1,54	1,07	-	-2,01	-2,50	
	3426	<i>CFI</i>	1,42	1,87	2,06	-	-	-	

Taula 13 (continuació). Gens del sistema immunitari expressats diferencialment en pàncrees i en illots de pacients amb DT1

Funció	Locus ID	Símbol	Log ₂ FC P1	Log ₂ FC P2	Log ₂ FC P3	Log ₂ FC P4	Log ₂ FC I1	Log ₂ FC I4	
Immuno-regulació	4345	<i>CD200</i>	-	-	-	-	-2,70	-2,56	
	11314	<i>CD300A</i>	-	1,58	0,88	-	-	-	
	2281	<i>FKBP1B</i>	-	-	-1,21	-	-	-	
	2289	<i>FKBP5</i>	1,67	-	-1,04	-	-	-	
	3133	<i>HLA-E</i>	2,23	1,05	1,01	-	-	-	
	3134	<i>HLA-F</i>	1,18	1,34	0,83	-	-	-	
	3135	<i>HLA-G</i>	1,27	1,40	1,13	-	-	-	
	10068	<i>IL18BP</i>	1,80	2,13	1,81	-	-	-	
	7850	<i>IL1R2</i>	1,43	-	-	-	-	-	
	3903	<i>LAIR1</i>	-	1,74	0,95	-	-	-	
	3956	<i>LGALS1</i>	-	1,60	-	-	-	-	
	3957	<i>LGALS2</i>	-	-	1,15	-	2,13	-	
	3965	<i>LGALS9</i>	-	1,32	0,64	-	-	-	
	10859	<i>LILRB1</i>	3,41	3,49	0,83	1,78	-	-	
	149041	<i>RC3H1</i>	-	1,61	-	1,15	-	-	
	5272	<i>SERPINB9</i>	-	-	1,73	-	-	-	
	710	<i>SERPING1</i>	2,08	2,12	1,73	-	-	-	
	140885	<i>SIRPA</i>	-	1,85	0,89	-	-	-	
	9021	<i>SOCS3</i>	-	1,77	1,14	1,14	-	-	
	10312	<i>TCIRG1</i>	-	-	-	-	-	1,44	
	7072	<i>TIA1</i>	-	1,45	1,19	-	-	-1,45	
	283131	<i>TncRNA</i>	-1,60	1,67	-	1,39	-	-	
	7128	<i>TNFAIP3</i>	-	1,98	-	-	-	-	
	11326	<i>VSIG4</i>	1,92	1,68	0,92	-	-	-	
	79679	<i>VTCN1</i>	1,57	2,13	1,55	-	-	-	
	6935	<i>ZEB1</i>	-3,19	-	-	-	-	1,62	
	Molècules d'adhesió	214	<i>ALCAM</i>	1,30	-	-	-	-1,48	-
		9936	<i>CD302</i>	1,28	-	1,64	1,64	-	-
		948	<i>CD36</i>	1,97	2,67	1,51	2,39	2,17	1,44
960		<i>CD44</i>	3,86	1,24	0,94	-	-	-	
961		<i>CD47</i>	1,64	1,51	1,26	1,08	-	-1,25	
962		<i>CD48</i>	-	1,69	-	-	-	-	
4267		<i>CD99</i>	-	-	1,28	-	-2,28	-2,21	
83692		<i>CD99L2</i>	-	-	-	-	-	-1,27	
3383		<i>ICAM1</i>	-	2,34	1,05	1,10	-	-	
3684		<i>ITGAM</i>	-	1,83	0,97	-	-	-	
3688		<i>ITGB1</i>	-	-	-	-	-	-1,63	
3689		<i>ITGB2</i>	1,57	3,24	1,69	-	-	-	
23421		<i>ITGB3BP</i>	1,27	-	-	-	-	-	
3694		<i>ITGB6</i>	1,10	-	-	-	-	-	
3696		<i>ITGB8</i>	-	1,34	-	-	-	-	
3964		<i>LGALS8</i>	1,89	-	-	-	-	-	
4162		<i>MCAM</i>	1,10	-	-	1,30	-	-	
5175		<i>PECAM1</i>	1,90	1,87	1,29	-	-	-	
7412		<i>VCAM1</i>	1,07	2,83	2,10	1,23	-	-	
Resposta a IFNs		23586	<i>DDX58</i>	-	-	1,42	-	-	-
	2633	<i>GBP1</i>	1,97	3,23	0,95	2,63	-	-	
	2634	<i>GBP2</i>	2,83	2,43	-	1,35	-	-	
	2635	<i>GBP3</i>	1,58	-	-	3,45	-	-	
	51191	<i>HERC5</i>	1,71	0,96	0,81	1,61	-	-	
	3428	<i>IFI16</i>	-	1,22	-	-	-	-	
	10437	<i>IFI30</i>	-	2,16	0,8	-	-	-	
	10561	<i>IFI44</i>	1,45	-	0,6	-	-	-	
	2537	<i>IFI6</i>	-	1,66	0,95	-	-	-	
	10581	<i>IFITM2</i>	1,29	1,02	0,73	-	-	-	
	10410	<i>IFITM3</i>	1,05	-	-	-	-	-	
	3455	<i>IFNAR2</i>	-	1,39	-	-	-	-	
	3659	<i>IRF1</i>	-	1,35	-	-	-	-	
	3660	<i>IRF2</i>	-	1,41	1,28	-	-	-	
	3664	<i>IRF6</i>	-	-	-1,12	-	-	-	
	3665	<i>IRF7</i>	-	-	-0,74	-	-	-	
	10379	<i>IRF9</i>	1,36	0,87	-	-	-	-	
	4332	<i>MNDA</i>	2,76	3,58	2,44	1,81	-	-	
	4599	<i>MX1</i>	1,00	1,36	-	-	-	-	

Taula 13 (continuació). Gens del sistema immunitari expressats diferencialment en pàncrees i en illots de pacients amb DT1

Funció	Locus ID	Símbol	Log ₂ FC P1	Log ₂ FC P2	Log ₂ FC P3	Log ₂ FC P4	Log ₂ FC I1	Log ₂ FC I4
Senyalització citocines	1436	<i>CSF1R</i>	-	1,78	1,46	-	-	-
	3587	<i>IL10RA</i>	-	2,29	1,63	-	-	-
	3588	<i>IL10RB</i>	-	1,50	-	-	-	-
	3597	<i>IL13RA1</i>	1,45	-	-	-	-	-
	55540	<i>IL17RB</i>	-	1,25	-0,79	1,79	1,70	1,55
	3554	<i>IL1R1</i>	-	1,76	1,13	-	-	-
	58985	<i>IL22RA1</i>	-	-	-	1,24	2,20	2,46
	9466	<i>IL27RA</i>	-	1,35	-	-	-	-
	9235	<i>IL32</i>	-	-	1,85	-	-	-
	3750	<i>IL6R</i>	-	-	-	-	-	-1,89
	3572	<i>IL6ST</i>	-	2,26	-0,71	1,10	-	-
	3609	<i>ILF3</i>	1,59	-	0,84	-	-	-
	4254	<i>KITLG</i>	2,18	1,34	0,62	0,93	-	-
	3977	<i>LIFR</i>	1,44	1,93	0,86	1,95	1,39	-
	10135	<i>PFEB1</i>	-	1,29	-	1,76	-	-
	4090	<i>SMAD5</i>	-	1,17	-	-	-	-
	4093	<i>SMAD9</i>	-	-	-	-	-1,50	-1,64
	10673	<i>TNFSF13B</i>	-	2,20	1,67	1,02	-	-
	7042	<i>TGFB2</i>	-	2,48	1,40	0,97	-	-1,66
	7048	<i>TGFBR2</i>	-	-	0,92	-	-	-
9839	<i>ZEB2</i>	-	3,13	1,62	1,59	-	-	
Senyalització	84674	<i>CARD6</i>	-	-	-0,77	-	-	-
	22900	<i>CARD8</i>	-	-	0,84	-	-	-
	963	<i>CD53</i>	-	1,81	0,89	-	-	-
	80790	<i>CMIP</i>	-	-	1,02	-	-1,77	-
	28514	<i>DLL1</i>	-	-	1,06	-	-	-
	1910	<i>EDNRB</i>	1,54	-	-	1,32	-	-
	2268	<i>FGR</i>	-	-	0,58	-	-	-
	2359	<i>FPRL2</i>	-	-	0,84	-	-	-
	2534	<i>FYN</i>	-	1,66	-	-	-	-
	3055	<i>HCK</i>	-	1,60	0,57	-	-	-
	3059	<i>HCLS1</i>	1,91	2,75	1,82	-	-	-
	182	<i>JAG1</i>	-	2,08	1,16	1,68	-	-
	3716	<i>JAK1</i>	-	1,30	-	1,10	-	-
	9404	<i>LPXN</i>	-	1,44	-	-	-	-
	4067	<i>LYN</i>	1,08	1,14	-	-	-	-
	5341	<i>PLEK</i>	-	2,29	0,84	-	-	-
	122769	<i>PPIL5</i>	-	-	-1,26	-	-	-
	5530	<i>PPP3CA</i>	-	1,59	0,81	-	-	-
	5734	<i>PTGER4</i>	-	-	-	1,39	-	2,35
	5795	<i>PTPRJ</i>	-	2,16	-	1,45	-	-
	10254	<i>STAM2</i>	-	-	0,96	-	-	-
	353376	<i>TICAM2</i>	-	-	-	-	-	-1,14
	92610	<i>TIFA</i>	-	-	-	-	1,78	-
	8792	<i>TNFRSF11A</i>	0,97	2,42	-	-	-2,61	-2,95
	7188	<i>TRAF5</i>	-	-	-	-	1,21	-
Limfòcits B i Igs	29760	<i>BLNK</i>	-	1,91	1,02	1,62	-	-
	8857	<i>FCGBP</i>	-	1,83	1,74	-	-	-
	3476	<i>IGBP1</i>	-	-	-	-	1,47	-
	3493	<i>IGHA1</i>	-	-	1,72	-	-	-
	3500	<i>IGHG1</i>	-	-	-	-	2,21	-
	3502	<i>IGHG3</i>	3,47	2,06	1,26	1,81	4,35	-1,35
	3507	<i>IGHM</i>	-	1,27	-	-	-	-
	3514	<i>IGKC</i>	-	-	-	-	3,60	-
	28902	<i>IGKV1D-13</i>	-	-	-	-	1,40	-
	3535	<i>IGL@</i>	1,21	1,67	0,89	1,16	2,34	-
	28831	<i>IGLJ3</i>	1,83	2,32	1,34	1,85	2,81	-
	91353	<i>IGLL3</i>	-	-	-	-	1,33	-
	118788	<i>PIK3AP1</i>	-	2,00	1,15	-	-	-
	Regulació transcripció	604	<i>BCL6</i>	-	2,27	-	1,61	-
83706		<i>FERMT3</i>	-	-	0,73	-	-	-
2624		<i>GATA2</i>	-	-	-	-	-	1,52
9935		<i>MAFB</i>	-	1,68	-	1,20	-1,37	-
10725		<i>NFAT5</i>	-	1,41	0,85	-	-	-
4775		<i>NFATC3</i>	-	-1,24	-1,12	-1,34	-	-
64332		<i>NFKBIZ</i>	-	-	1,47	-	1,63	-
10062		<i>NR1H3</i>	-	-	1,48	-	-	-
5971		<i>RELB</i>	-	1,67	0,84	-	-	-
6772		<i>STAT1</i>	1,27	1,94	-	-	-	-
6925		<i>TCF4</i>	1,26	1,80	0,92	1,40	-	-1,21
1831		<i>TSC22D3</i>	-	1,16	-	-	-	-
222643		<i>UNC5CL</i>	1,35	-	-	-	-	-
26137		<i>ZBTB20</i>	-	1,91	0,96	-	-	-
7763		<i>ZFAND5</i>	-	-	-1,09	-	-	-

Taula 13 (continuació). Gens del sistema immunitari expressats diferencialment en pàncrees i en illots de pacients amb DT1

Funció	Locus ID	Símbol	Log ₂ FC P1	Log ₂ FC P2	Log ₂ FC P3	Log ₂ FC P4	Log ₂ FC I1	Log ₂ FC I4
Apoptosi	597	<i>BCL2A1</i>	1,05	3,65	-	-	-	-
	330	<i>BIRC3</i>	-	2,90	1,00	1,25	-	-
	834	<i>CASP1</i>	-	1,79	0,99	-	-	-
	55179	<i>FAIM</i>	1,46	-	0,51	0,95	-	-
	55303	<i>GIMAP4</i>	-	1,49	0,75	-	-	-
	5552	<i>SRGN</i>	-	-	1,29	-	-	-
	8797	<i>TNFRSF10A</i>	-	-	-1,38	-	-	-
	55504	<i>TNFRSF19</i>	1,06	-	1,17	-	-	-
	8743	<i>TNFSF10</i>	2,27	2,39	0,94	-	-	-
Limfòcits T	2533	<i>FYB</i>	-	-	0,77	-	-	-
	84868	<i>HAVCR2</i>	-	1,88	0,92	-	-	-
	9452	<i>ITM2A</i>	1,97	-	-	-	-	-
	3936	<i>LCP1</i>	0,94	2,08	1,31	-	-	-
	9840	<i>ONECUT2</i>	-	-	1,25	-	-1,82	-2,67
	5588	<i>PRKCQ</i>	-	-	0,93	1,38	-	-
	6503	<i>SLA</i>	-	1,88	-	-	-	-
	7070	<i>THY1</i>	-	1,91	0,88	-	-	-
	9760	<i>TOX</i>	-	-	-	-	-2,91	-3,96
Macròfags	54	<i>ACPS</i>	-	1,43	-	-	-	-
	9332	<i>CD163</i>	1,90	-	-	-	1,63	-2,02
	968	<i>CD68</i>	-	1,38	-	-	-	-
	23531	<i>MMD</i>	-	1,14	-	-	-	-
	219972	<i>MPEG1</i>	2,01	3,01	2,37	1,35	-	-
	80149	<i>ZC3H12A</i>	-	-	-	-	1,90	-
Neutròfils	57118	<i>CAMK1D</i>	1,21	-	-	-	-	1,64
	1511	<i>CTSG</i>	-	-	1,11	-	-	-
	79887	<i>FLJ22662</i>	-	-	1,75	-	-	-
	4688	<i>NCF2</i>	-	2,60	1,83	-	-	-
DCs	57556	<i>SEMA6A</i>	1,15	1,82	1,36	1,66	-	-
	28959	<i>TMEM176B</i>	-	-	-	2,44	-1,40	-
	54209	<i>TREM2</i>	-	1,19	-	-	-	-
Receptors Fc	2207	<i>FCER1G</i>	1,32	2,70	2,49	-	-	-
	2209	<i>FCGR1A</i>	-	1,74	0,93	-	-	-
	2210	<i>FCGR1B</i>	-	2,56	1,71	1,01	-	-
Marcadors leucocitaris	8832	<i>CD84</i>	0,99	1,92	1,34	1,25	-	-
	5788	<i>PTPRC</i>	1,64	3,55	2,25	1,14	-	-
Cèl.lules NK	22914	<i>KLRK1</i>	-	1,27	-	-	-	-
	7305	<i>TYROBP</i>	1,40	3,14	1,9	-	-	-
Mastòcits	7177	<i>TPSAB1</i>	-	-	1,46	-	-	-
	64499	<i>TPSB2</i>	-	-	1,51	-	-	-
Migració cel.lular	10154	<i>PLXNC1</i>	1,40	3,35	2,84	2,13	-1,73	-1,28
	5420	<i>PODXL</i>	1,42	-	-	-	-	1,46
Citotoxicitat	23705	<i>CADM1</i>	-	-	1,37	-	-2,60	-2,33
Citoesquelet	23075	<i>SWAP70</i>	-	-	-	0,96	-	-
Degranulació	25801	<i>GCA</i>	1,03	1,25	-	1,00	-	-
Lisosomes	7805	<i>LAPTMS</i>	1,87	3,59	2,35	-	-	-
Activació cel.lular	9976	<i>CLEC2B</i>	-	-	-	-	1,57	-
Estrès oxidatiu	1536	<i>CYBB</i>	1,54	3,47	-	1,04	-	-
Fagocitosi	22918	<i>CD93</i>	-	-	1,34	-	-	-
Plaquetes	10461	<i>MERTK</i>	-	1,59	0,76	-	-	-
Proteòlisi	290	<i>ANPEP</i>	-	-	0,93	1,49	-	1,84
Reparació	81035	<i>COLEC12</i>	-	1,37	-	1,20	-	-
Endoteli	10085	<i>EDIL3</i>	-	-	-0,99	-	-3,13	-4,29
Funció desconeguda	7920	<i>BAT5</i>	-	-	-	-	-1,27	-
	11119	<i>BTN3A1</i>	-	1,41	-	-	-	-
	11118	<i>BTN3A2</i>	1,33	2,23	1,37	-	-	-
	10384	<i>BTN3A3</i>	1,74	2,41	1,14	-	-	-
	1043	<i>CD52</i>	0,92	4,01	1,53	0,93	-	-
	2124	<i>EVI2B</i>	-	2,88	-	-	-	-
	168537	<i>GIMAP7</i>	1,53	1,30	-	1,20	-	-
	10261	<i>IGSF6</i>	0,93	3,04	1,25	-	-	-
	3321	<i>ISGF3</i>	-	1,31	-	-	-	-
	4033	<i>LRMP</i>	-	-	-	-	-	1,43
	7940	<i>LST1</i>	1,14	2,24	1,29	-	-	-
3071	<i>NCKAP1L</i>	-	1,40	-	-	-	-	

P1: pàncrees Cas 1; P2: pàncrees Cas 2; P3: pàncrees Cas 3; P4: pàncrees Cas 4; I1: illots Cas 1; I4: illots Cas 4. El log₂FC dels gens sobreexpressats s'ha destacat en vermell i el dels d'expressió reduïda en verd.

Mitjançant microarrays no es va detectar una inducció de l'expressió de citocines, però sí d'alguns gens de receptors (*IL1R1*, *IL6R*, *IL17RB*, *IL10RA*) i de gens de senyalització d'aquestes (*IL6ST*). Mitjançant el programa Ingenuity, es va comparar l'expressió de gens de pertanyents a les vies funcionals de les citocines proinflamatòries IL-1 β , IL-6, IL-17 i d'IFNs de tipus 1 (IFN α i IFN β) i de tipus II (IFN γ). Els resultats corresponents al pàncrees del Cas 1 s'esquematitzen a la **Figura 20**. La resta, es mostren com a material suplementari en format digital. La majoria de gens amb associacions directes i indirectes les citocines esmentades, es troben sobreexpressats en pàncrees total, de forma més prominent en els casos 1, 2 i 3.

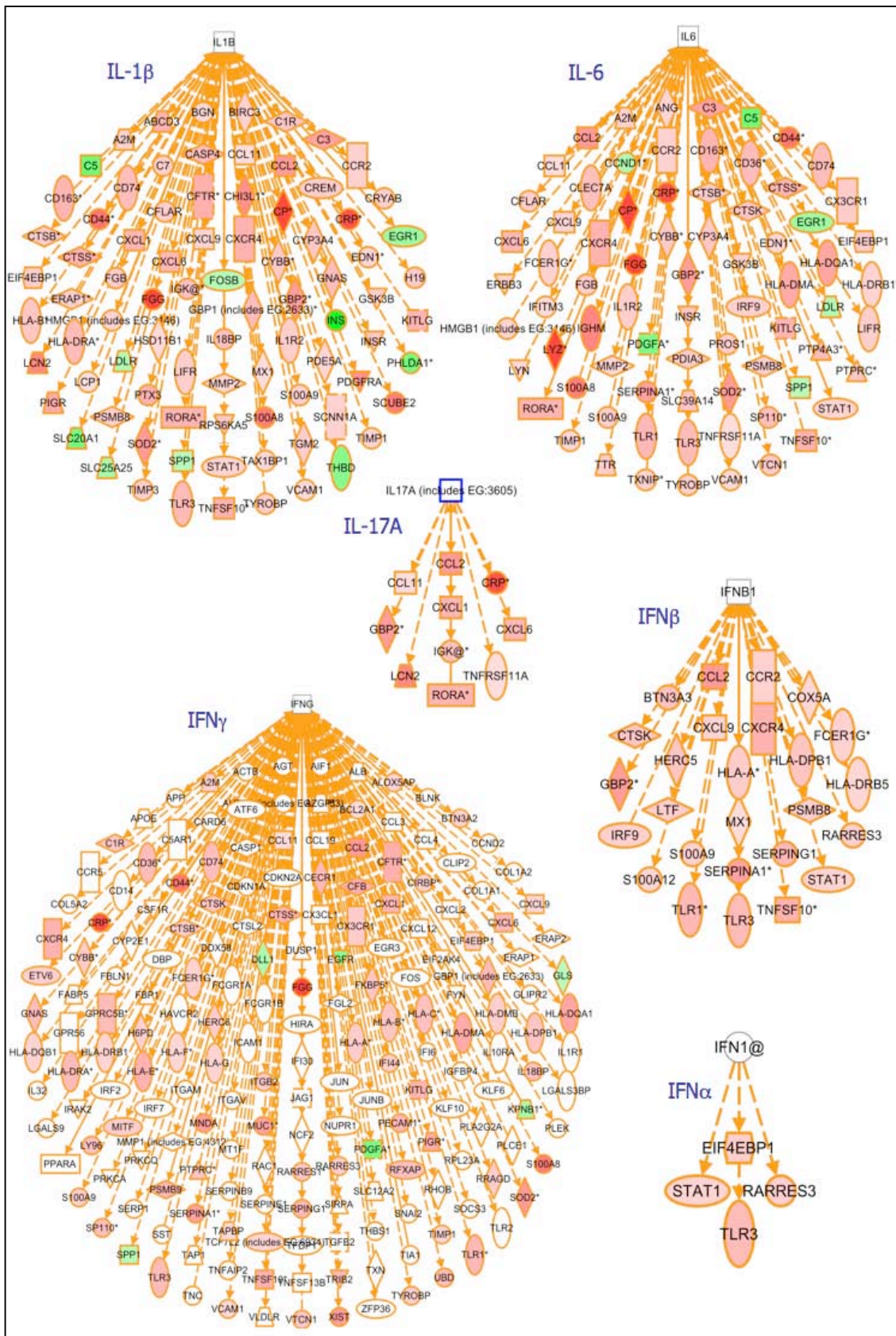


Figura 20. Expressió dels gens pertanyents a les vies funcionals d'IL-1β, IL-6, IL-17, IFNα, IFNβ i IFNγ. Es mostren els resultats corresponents al Cas 1 (pàncreas). Anàlisi realitzada mitjançant el programa Ingenuity (IPA). S'indiquen tant les associacions directes com les indirectes. Els gens sobreexpressats es destaquen en vermell, els d'expressió reduïda en verd i els gens sense variacions significatives no es mostren destacats.

1.2.4. Variacions transcripcionals indicatives de dany tissular i reparació/regeneració

En les mostres dels 4 casos es van observar alteracions d'expressió en gens indicatius de dany tissular. Un exemple és l'augment d'expressió dels factors pro-apoptòtics TRAIL, *TNFSF10*, en els casos 1, 2 i 3 i caspasa 1 en els casos 2 i 3 en pàncrees total. En els illots purificats del Cas 1, es va observar també un augment d'expressió d'un conjunt de proteïnes de xoc tèrmic de les famílies HSP40 i HSP70 (*HSPA6*, *HSPA1A*, *HSPA1B*, etc.). També es va detectar un augment d'expressió de gens relacionats amb dany oxidatiu en pàncrees, amb efecte protector, com per exemple la superòxid dismutasa *SOD2*, i metal·lotioneïnes com *MT1M* (gen sobreexpressat en pàncrees i en illots en tots els casos analitzats). A més de factors de dany tissular, es van detectar també variacions transcripcionals de gens involucrats en regeneració insular i proliferació cel·lular. Per exemple, es va detectar un augment d'expressió de membres de la família REG: *REG3A* i *REG3G* en pàncrees total, i *REG4* en illots purificats.

1.2.5. Alteració de gens de les cèl·lules endocrines insulars

La part endocrina del pàncrees representa només un 1-2% del total de l'òrgan. Degut a aquest fet, la majoria de les variacions transcripcionals pròpies de les cèl·lules endocrines detectades en illots purificats no es van detectar en pàncrees total. Aquest és el cas de la reducció d'expressió dels gens d'autoantígens de la DT1: en illots purificats es va observar una forta reducció d'expressió d'insulina (*INS*), *GAD2*, IGRP (*G6PC2*), *ICA1L*, IA-2 (*PTPRN*), IA-2 β (*PTPRN2*) i *SLC30A8*; en pàncrees total, en canvi, només la insulina es va detectar menor expressada significativament. A banda dels autoantígens, es van detectar variacions d'expressió d'altres gens endocrins i del sistema nerviós, tal com s'observa en els perfils representats en forma de *heatmap* a la **Figura 21**. Als illots purificats dels casos 1 i 4 es va observar una disminució d'expressió de trànscripats propis de les cèl·lules β implicats en el processament (carboxipeptidasa E o *CPE*, proproteïna convertasa o *PCSK1*) i la secreció (*ABCC8*, *SCGM*) d'insulina i de factors de transcripció endocrins, com per exemple *INSM1*, *PAX6* i *NEUROD1*. A banda de la insulina, es van observar variacions transcripcionals en d'altres hormones insulars, com una forta reducció de l'expressió d'amilina o *IAPP*, hormona co-secretada en els grànuls d'insulina per les cèl·lules β . D'altres hormones van mostrar alteracions transcripcionals variant de perfil segons el cas, com per exemple el glucagó (augmentat en casos 2 i 4 i disminuït en Cas 3) somatostatina (disminuïda en casos 1 i 3 i mostrant resultats divergents en pàncrees i illots en Cas 4) i polipèptid pancreàtic (disminuït en casos 1 i 4, i sent el gen més sobreexpressat en casos 2 i 3). En quant a receptors d'hormones insulars, als illots del Cas 1 es va observar un augment de l'expressió del receptor d'insulina (*INSR*) i de somatostatina (*SSTR1*). Als illots purificats dels casos 1 i 4 s'hi va detectar una disminució de l'expressió de gens implicats en excitosi, com secretogranina 3 (*SCGR3*) i les sinaptotagmines *SYT4* i *SYT13*.

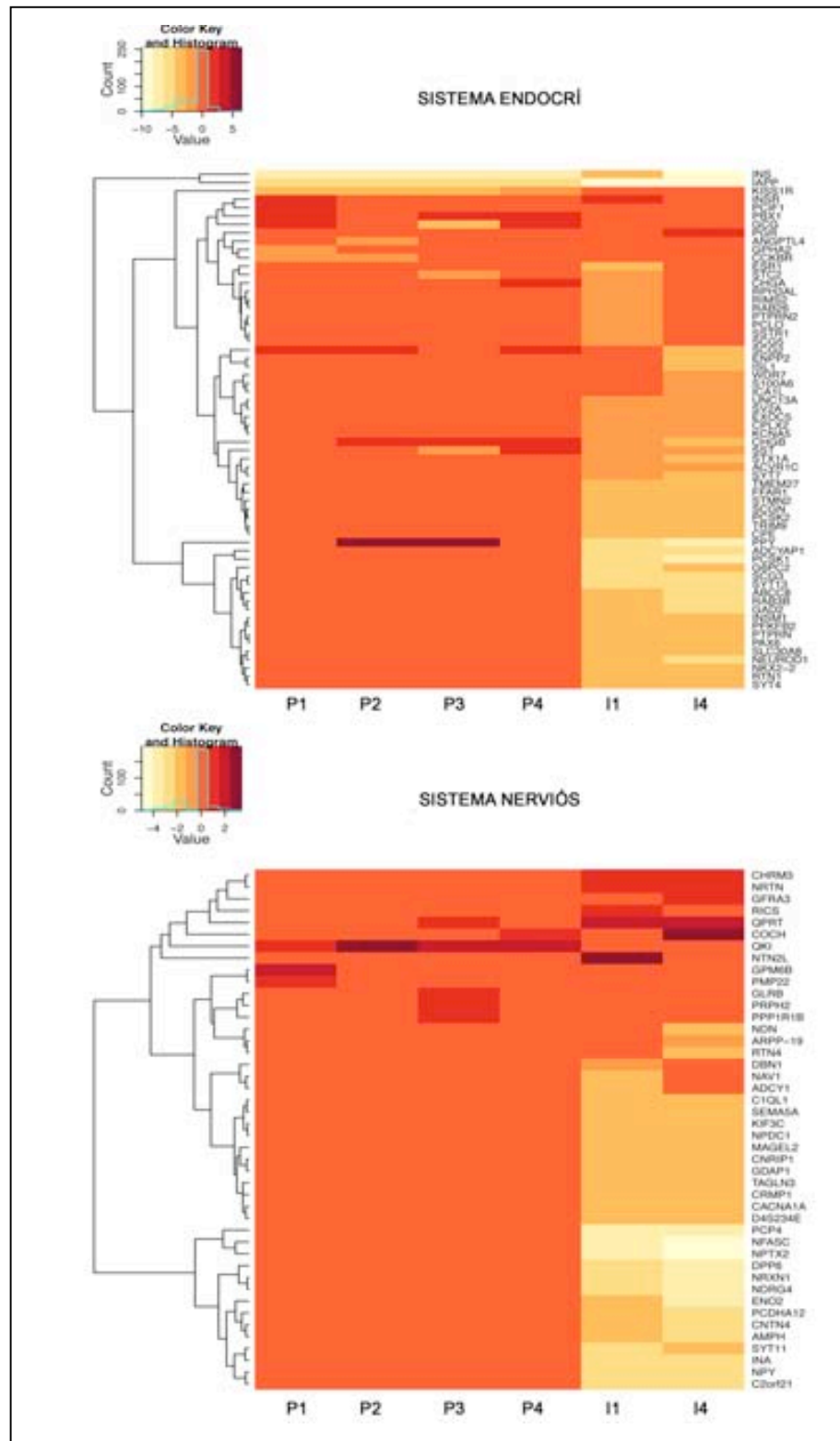


Figura 21. Representació en forma de heatmap dels perfils d'expressió de gens dels sistemes endocrí i nerviós. Cada fila correspon a un gen i cada columna a un cas (P1: pàncrees del Cas 1, P2: pàncrees del Cas 2, P3: pàncrees del Cas 3, P4: pàncrees del Cas 4; I1: pàncrees del Cas 1, I4: pàncrees del Cas 4). Els valors d'expressió es mostren com a \log_2FC . El codi de colors segons el \log_2FC es mostra a l'extrem superior esquerre per cada heatmap.

1.2.6. Reducció de trànscripats propis del sistema nerviós

Als illots en els casos de DT1 es va detectar una reducció d'un conjunt de trànscripats propis del sistema nerviós, principalment expressats en neurones, com per exemple la pentraxina neuronal *NPTX2*, enolasa neuronal específica *ENO2*, neuropèptid Y o *NPY* i neurofascina o *NFASC*, entre d'altres. Aquest perfil d'expressió reduïda es va detectar només en els illots pancreàtics purificats (casos 1 i 4) però no en pàncrees total, on sí es va observar un augment transcripcional en tots els casos del gen *QKI*, implicat en la mielinització.

1.2.7. Afectació de gens del teixit exocrí

En el perfil d'expressió gènica corresponent al pàncrees total del Cas 1 –inici clínic- es va detectar un conjunt de gens d'enzims digestius secretats pel teixit exocrí amb expressió significativament reduïda, com per exemple amilasa (*AMY1A*), aquaporina 12 (*AQP12*), elastases, proteïna dels grànuls de zimogen 16 (*ZG16*), etc. El gen més sobreexpressat en aquest mateix cas és *NMES1*, un gen de funció desconeguda però expressat al sistema digestiu. Els gens propis del teixit pancreàtic expressats diferencialment (teixit endocrí, teixit exocrí i sistema nerviós) es detallen a la **Taula 14**. Una taula addicional amb el nom complet dels gens s'inclou com a material suplementari en format digital.

Taula 14. Gens dels sistemes endocrí, nerviós i exocrí expressats diferencialment

Categoria	Locus ID	Symbol	log ₂ FC P1	log ₂ FC P2	log ₂ FC P3	log ₂ FC P4	log ₂ FC I1	log ₂ FC I4
Autoanti-gens	2562	<i>GAD2</i>	-	-	-	-	-4,13	-4,58
	57818	<i>G6PC2</i>	-	-	-	-	-5,10	-4,34
	130026	<i>ICA1L</i>	-	-	-	-	-	-2,02
	3630	<i>INS</i>	-6,57	-6,68	-7,38	-7,38	-2,96	-9,05
	5798	<i>PTPRN</i>	-	-	-	-	-3,53	-4,46
	5799	<i>PTPRN2</i>	-	-	-	-	-1,88	-
	169026	<i>SLC30A8</i>	-	-	-	-	-3,09	-4,48
Hormones/receptors	116	<i>ADCYAP1</i>	-	-	-	-	-5,63	-5,93
	51129	<i>ANGPTL4</i>	-	-1,59	-	-	-	-
	887	<i>CCKBR</i>	-1,94	-1,44	-	-	-	-
	1113	<i>CHGA</i>	-	-	-	1,01	-1,79	-
	1114	<i>CHGB</i>	-	2,21	2,11	1,72	-2,28	-3,26
	2099	<i>ESR1</i>	-	-	-	-	-3,43	-
	2641	<i>GCG</i>	1,15	-	-2,92	1,91	-	-
	170589	<i>GPHA2</i>	-1,54	-	-	-	-	-
	3375	<i>IAPP</i>	-5,84	-5,40	-5,68	-5,72	-8,95	-10,01
	3643	<i>INSR</i>	1,63	-	-	-	2,01	-
	84634	<i>KISS1R</i>	-3,31	-3,05	-2,95	-2,68	-	-
	5241	<i>PGR</i>	-	-	-	-	-	2,35
	5539	<i>PPY</i>	-	5,35	6,47	-	-4,63	-6,87
	7857	<i>SCG2</i>	1,08	1,41	-	1,46	-	-4,07
	6447	<i>SCG5</i>	-	-	-	-	-2,38	-
6750	<i>SST</i>	-	-	-1,33	1,55	-2,41	-2,29	
6751	<i>SSTR1</i>	-	-	-	-	-2,31	-	
8614	<i>STC2</i>	-	-	-1,09	-	-2,63	-	
Secreció d'insulina	3741	<i>KCNA5</i>	-	-	-	-	-1,77	-2,24
	27445	<i>PCLO</i>	-	-	-	-	-2,11	-
	130399	<i>ACVR1C</i>	-	-	-	-	-2,44	-2,40
	5126	<i>PCSK2</i>	-	-	-	-	-2,98	-3,56
	10590	<i>SCGN</i>	-	-	-	-	-3,08	-3,32
	57393	<i>TMEM27</i>	-	-	-	-	-3,20	-2,93
	1363	<i>CPE</i>	-	-	-	-	-3,24	-3,71
	2864	<i>FFAR1</i>	-	-	-	-	-3,64	-3,52
	5208	<i>PFKFB2</i>	-	-	-	-	-3,77	-4,02
	6833	<i>ABCC8</i>	-	-	-	-	-3,77	-5,23
	5122	<i>PCSK1</i>	-	-	-	-	-5,60	-7,91
	5168	<i>ENPP2</i>	-	-	-	-	-	-3,11
	6277	<i>S100A6</i>	-	-	-	-	-	-1,65

Taula 14 (continuació). Gens dels sistemes endocrí, nerviós i exocrí expressats diferencialment

Categoria	Locus ID	Symbol	log ₂ FC P1	log ₂ FC P2	log ₂ FC P3	log ₂ FC P4	log ₂ FC I1	log ₂ FC I4
Factors transcripció endocrins	3642	<i>INSM1</i>	-	-	-	-	-3,62	-4,09
	3760	<i>ISL1</i>	-	-	-	-	-	-3,47
	4760	<i>NEUROD1</i>	-	-	-	-	-2,95	-4,78
	4821	<i>NKX2-2</i>	-	-	-	-	-2,73	-4,23
	5080	<i>PAX6</i>	-	-	-	-	-3,58	-4,44
	5087	<i>PBX1</i>	1,01	-	1,37	2,40	-	-
63935	<i>PCIF1</i>	1,95	-	-	-	-	-	
Exocrí	276	<i>AMY1A</i>	-2,34	-	-	-	-2,05	-
	375318	<i>AQP12A</i>	-1,17	-	-	-	-	-
	5407	<i>PNLIPRP1</i>	-1,29	-	0,78	-	-	2,58
	123887	<i>ZG16</i>	-1,77	-0,92	-	-	-	-
	3816	<i>KLK1</i>	-1,20	-	-	-	-	1,13
	342898	<i>SYCN</i>	-2,55	-	-	-	-	-
	51032	<i>ELA2B</i>	-4,00	-	-	-	-2,38	-
	1990	<i>ELA1</i>	-1,78	-	-0,56	-	-	-
	2813	<i>GP2</i>	-	-1,79	-	-	-	-
Sistema nerviós	107	<i>ADCY1</i>	-	-	-	-	-1,64	-
	273	<i>AMPH</i>	-	-	-	-	-1,84	-2,60
	10776	<i>ARPP-19</i>	-	-	-	-	-	-1,18
	10882	<i>C1QL1</i>	-	-	-	-	-1,37	-1,34
	285175	<i>C2orf21</i>	-	-	-	-	-2,78	-2,81
	773	<i>CACNA1A</i>	-	-	-	-	-1,82	-1,55
	1131	<i>CHRM3</i>	-	-	-	-	1,22	1,50
	25927	<i>CNRIP1</i>	-	-	-	-	-1,28	-1,71
	152330	<i>CNTN4</i>	-	-	-	-	-1,69	-2,57
	1690	<i>COCH</i>	-	-	-	-1,35	-	3,05
	1400	<i>CRMP1</i>	-	-	-	-	-1,62	-1,67
	27065	<i>D4S234E</i>	-	-	-	-	-1,95	-1,65
	1627	<i>DBN1</i>	-	-	-	-	-1,14	-
	1804	<i>DPP6</i>	-	-	-	-	-2,24	-3,77
	2026	<i>ENO2</i>	-	-	-	-	-1,91	-3,22
	54332	<i>GDAP1</i>	-	-	-	-	-1,37	-1,78
	2676	<i>GFRA3</i>	-	-	-	-	-	1,35
	2743	<i>GLRB</i>	-	-	1,36	-	-	-
	2824	<i>GPM6B</i>	1,60	-	-	-	-	-
	9118	<i>INA</i>	-	-	-	-	-2,46	-2,27
	3797	<i>KIF3C</i>	-	-	-	-	-1,66	-1,30
	54551	<i>MAGEL2</i>	-	-	-	-	-1,57	-2,11
	89796	<i>NAV1</i>	-	-	-	-	-1,49	-
	4692	<i>NDN</i>	-	-	-	-	-	-1,42
	65009	<i>NDRG4</i>	-	-	-	-	-2,64	-3,42
	23114	<i>NFASC</i>	-	-	-	-	-3,17	-4,25
	56654	<i>NPDC1</i>	-	-	-	-	-1,62	-1,36
	4885	<i>NPTX2</i>	-	-	-	-	-3,36	-4,98
	4852	<i>NPY</i>	-	-	-	-	-2,62	-2,87
	4902	<i>NRTN</i>	-	-	-	-	1,21	1,33
	9378	<i>NRXN1</i>	-	-	-	-	-2,62	-3,35
	4917	<i>NTN2L</i>	-	-	-	-	3,38	-
	56137	<i>PCDHA12</i>	-	-	-	-	-2,07	-2,49
	5121	<i>PCP4</i>	-	-	-	-	-3,82	-3,60
	5376	<i>PMP22</i>	1,50	-	-	-	-	-
	84152	<i>PPP1R1B</i>	-	-	0,70	-	-	-
	5961	<i>PRPH2</i>	-	-	1,03	-	-	-
	9444	<i>QKI</i>	1,35	2,56	1,60	1,58	-	-
	23475	<i>QPRT</i>	-	-	0,81	-	2,04	1,75
	9743	<i>RICS</i>	-	-	-	-	1,18	-
	57142	<i>RTN4</i>	-	-	-	-	-	-1,28
	9037	<i>SEMA5A</i>	-	-	-	-	-1,41	-1,44
	23208	<i>SYT11</i>	-	-	-	-	-2,43	-2,07
29114	<i>TAGLN3</i>	-	-	-	-	-1,88	-1,88	

Taula 14 (continuació). Gens dels sistemes endocrí, nerviós i exocrí expressats diferencialment

Categoria	Locus ID	Symbol	log ₂ FC P1	log ₂ FC P2	log ₂ FC P3	log ₂ FC P4	log ₂ FC I1	log ₂ FC I4
Exocitosi	9501	<i>RPH3AL</i>	-	-	-	-	-1,32	-
	10640	<i>EXOC5</i>	-	-	-	-	-1,38	-1,87
	23025	<i>UNC13A</i>	-	-	-	-	-1,50	-1,27
	9699	<i>RIMS2</i>	-	-	-	-	-1,62	-
	9900	<i>SV2A</i>	-	-	-	-	-1,65	-1,51
	25837	<i>RAB26</i>	-	-	-	-	-1,73	-
	10814	<i>CPLX2</i>	-	-	-	-	-1,86	-1,99
	6804	<i>STX1A</i>	-	-	-	-	-2,25	-3,46
	9066	<i>SYT7</i>	-	-	-	-	-2,47	-2,72
	11075	<i>STMN2</i>	-	-	-	-	-2,75	-3,69
	114088	<i>TRIM9</i>	-	-	-	-	-3,16	-3,73
	6252	<i>RTN1</i>	-	-	-	-	-3,19	-3,94
	6860	<i>SYT4</i>	-	-	-	-	-3,26	-4,16
	5865	<i>RAB3B</i>	-	-	-	-	-3,89	-4,76
	57586	<i>SYT13</i>	-	-	-	-	-4,52	-5,58
	29106	<i>SCG3</i>	-	-	-	-	-4,58	-5,41
23335	<i>WDR7</i>	-	-	-	-	-	-1,26	

P1: pàncrees Cas 1; P2: pàncrees Cas 2; P3: pàncrees Cas 3; P4: pàncrees Cas 4; I1: illots Cas 1; I4: illots Cas 4. El log₂FC dels gens sobreexpressats en els casos de DT1 s'ha destacat en vermell i el dels d'expressió reduïda en verd.

1.3. VALIDACIÓ DE LES DADES DE MICROARRAYS MITJANÇANT qPCR

A partir de l'anàlisi anterior es van seleccionar 21 gens per ser validats mitjançant una tècnica alternativa als *microarrays*. Es va obtenir una quantificació relativa respecte el gen hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa 1 (*HPRT1*). *HPRT1* es va seleccionar com a calibrador d'entre set gens possibles d'expressió constitutiva (*18S*, *GAPDH*, β-actina, α-tubulina A1, ubiquitina B, α3-tubulina i *HPRT1*) ja que en experiments preliminars va ser el que va mostrar menys variació entre mostres. Es va calcular l'eficiència d'amplificació d'una selecció de 12 dels parells d'encebadors utilitzats. De forma teòrica els valors d'eficiència d'amplificació s'aproximen a 2, ja que a partir d'una molècula se'n generen dues, i han de ser semblants pels gens a testar i pel gen constituïu. A la **Taula 15**, es mostren els valors d'eficiència d'amplificació obtinguts segons la fórmula $E=10^{(-1/\text{pendent de corba patró})}$. La corba patró es va obtenir mitjançant dilucions seriades d'una mostra de cDNA, i l'eficiència es va calcular mitjançant el programa d'anàlisi de l'equip LightCycler® 480.

Taula 15. Valors d'eficiència d'amplificació

GEN	EFICIÈNCIA
<i>HPRT1</i>	1,688
<i>REG3A</i>	2,110
<i>CD44</i>	1,934
<i>IFNAR2</i>	1,734
<i>IL-8</i>	1,957
<i>PNLIP</i>	1,954
<i>HLA-E</i>	1,923
<i>TRAIL</i>	1,562
<i>INS</i>	1,917
<i>REG4</i>	1,381

El valor de l'eficiència d'amplificació del gen *HPRT1* va resultar semblant als valors de la resta de gens. Posteriorment es van validar les variacions d'expressió de 21 gens detectades mitjançant *microarrays*. Es van validar les variacions en l'expressió de *NMES1*, *CRP*, *REG3A*, *TLR3*, *CD44*, *HLA-E*, *CD36*, *S100A8*, *TNFSF10* (TRAIL), *IFNAR2*, *IL8*, *CXCL1*, *INS*, *PNLIP*, *ERAP2*, *PPY* en pàncrees total i de *CD36*, *INS*, *PPY*, *REG4*, *LYZ*, *CXCL12*, *HSPA6* i *INSR* en illots purificats de pacients amb DT1. Per tant, es van considerar validades les variacions transcripcionals detectades mitjançant *microarrays*. A la **Figura 22** es mostren els resultats de la validació mitjançant qPCR.

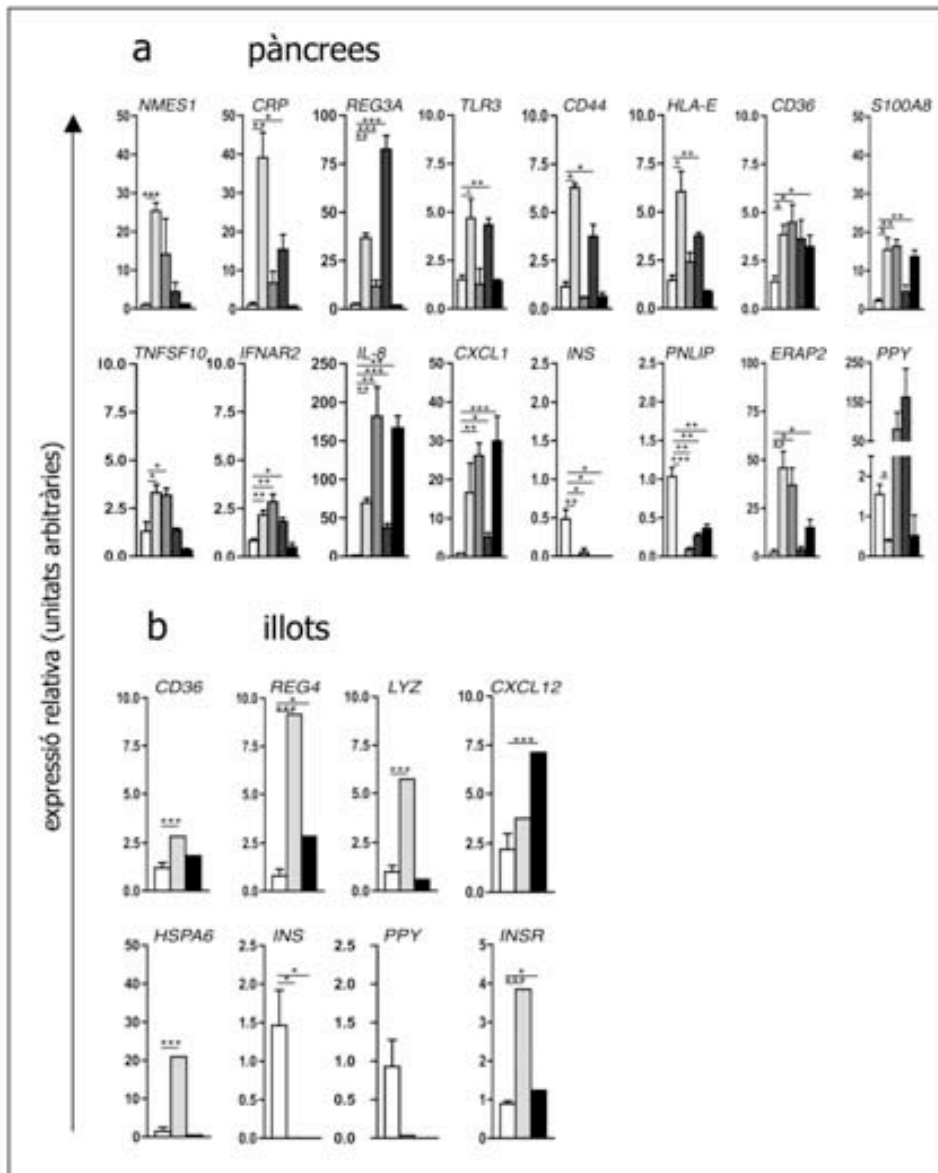


Figura 22. Validació de l'expressió gènica diferencial mitjançant qPCR. Histogrames corresponents a l'expressió relativa de 21 gens en pàncrees i en illots de pacients amb DT1 respecte controls. L'expressió relativa de cada gen es va determinar en funció de l'expressió d'*HPRT1*, gen d'expressió constitutiva, i d'una mostra calibradora (*pool* de totes les mostres control). En les mostres de pàncrees total es van obtenir el valor de la mitjana de tres a cinc blocs de teixit (cas 1) i tres blocs de teixit (casos 1, 2 i 4) i es van comparar respecte la mitjana de tres blocs de diferents controls (test t-Student). En les mostres d'illots purificats, es va comparar les mostres dels casos 1 i 4 amb la mitjana de quatre mostres de controls (*one sample t-test*). Pels càlculs es va aplicar el mètode $2^{-\Delta\Delta C_p}$. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm EEM (error estàndard de la mitjana); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

1.4. DISTRIBUCIÓ TISSULAR DE FACTORS DIFERENCIALMENT EXPRESSATS

Alguns dels gens amb expressió alterada al teixit diana de la DT1 en els casos analitzats es van estudiar mitjançant immunohistologia per validar-ne la seva afectació a nivell proteic i per observar la distribució tissular d'aquestes alteracions. A la **Figura 23** es mostren imatges representatives d'aquesta anàlisi.

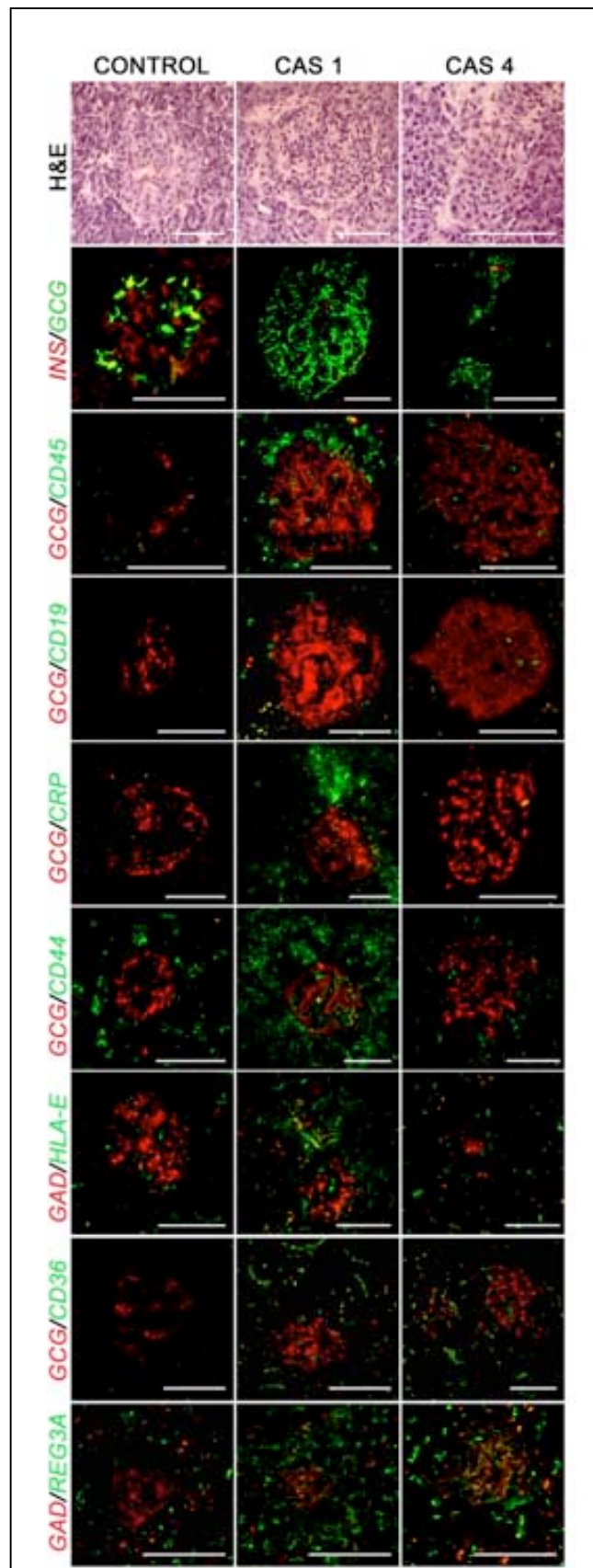


Figura 23. Anàlisi immunohistològica de marcadors alterats en la DT1. Imatges corresponents a tincions mitjançant doble immunofluorescència indirecta de marcadors alterats en mostres de teixit pancreàtic pacients amb DT1 (insulina, CD45, CRP, CD44, HLA-E, CD36 i REG3A). Com a marcadors específics d'illot es van utilitzar GAD i glucagó. La columna de l'esquerra correspon a un pàncrees control, la del centre al Cas 1 i la de la dreta al Cas 4. Magnificació: 200x. Les barres horitzontals corresponen a 100 µm.

Tal i com es reflecteix a la **Figura 23**, als illots dels casos 1 i 4 es va observar una reducció de cèl.lules β , tot i que es van detectar de forma ocasional fins i tot en el Cas 4, corresponent a 10 anys després de l'inici clínic. En canvi, la població de cèl.lules positives per glucagó va mostrar-se relativament augmentada als illots de tots dos casos en comparació amb els controls. En quant a la insulinitis, es van observar cèl.lules CD45⁺ al voltant i dins els illots, de forma molt més prominent en el Cas 1 que en el Cas 4 però detectables en tots dos. Es va observar també la presència de cèl.lules B (CD19⁺) als illots, principalment al voltant però ocasionalment també dins els illots en tots dos casos. La proteïna de fase aguda CRP, sobreexpressada a nivell de mRNA en els casos 1, 2 i 3, es va detectar en regions de cèl.lules de teixit exocrí. CD44, receptor de l'àcid hialurònic i molécula d'adhesió, es va detectar expressat moderadament al teixit exocrí en controls no diabètics i en el Cas 4, i sobreexpressat en el Cas 1. En la majoria de cèl.lules CD44⁺, no es observava co-localització amb cèl.lules CD45⁺ (resultats no mostrats). La molècula d'HLA no clàssic HLA-E, sobreexpressada a nivell de mRNA en els casos 1, 2 i 3, es va observar en cèl.lules del teixit exocrí properes als illots, algunes cèl.lules β de forma ocasional i algunes cèl.lules CD45⁺. El receptor *scavenger* i molécula d'adhesió CD36, sobreexpressat en pàncrees i en illots dels quatre casos de DT1, es va localitzar en cèl.lules endotelials (positives pel marcador endotelial Factor VIII, resultats no mostrats). REG3A, marcador de regeneració d'illots, lectina amb efecte antimicrobià i possible autoantigen en DT1, es va observar augmentat tots els casos de pacients tant en illots com en teixit exocrí.

2. MICROQUIMERISME MATERN EN PÀNCREES EN LA DT1

2.1. INCREMENT DE MMc EN PÀNCREES DE PACIENTS AMB DT1

El microquimerisme matern o MMc s'ha associat a l'autoimmunitat i s'ha detectat incrementat en en sang i en teixits de pacients amb malalties autoimmunitàries, entre elles la DT1. Amb l'objectiu d'estudiar el MMc en els casos de pacients amb DT1 analitzats es va determinar la presència de cèl.lules maternes en seccions pancreàtiques de tres pacients amb DT1 (Cas 2, Cas 3 i Cas 4) i dos controls (Control 2 i Control 4), tots ells homes per poder distingir les cèl.lules d'origen matern (XX) de les del propi hoste (XY) mitjançant sondes FISH específiques pels cromosomes X i Y. El resultat va ser la detecció de cèl.lules d'origen matern en tots els pàncrees analitzats. A la **Figura 24** se'n mostren dos exemples:

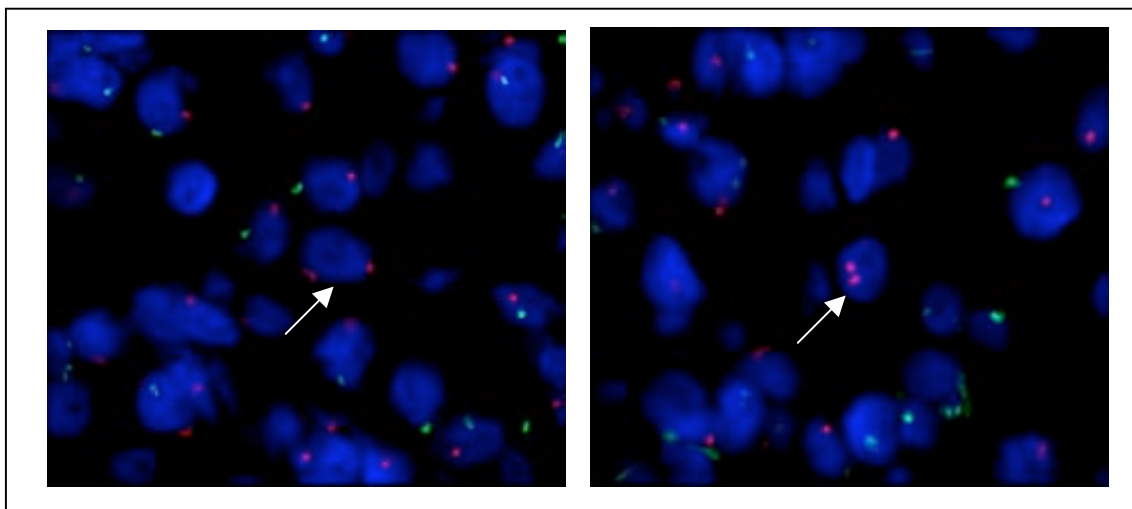


Figura 24. Nuclis de cèl.lules d'origen matern en pàncrees. Imatges de FISH en una secció de pàncrees del Cas 3 (esquerra) i un pàncrees control (dreta). Al centre de cada imatge s'observa un nucli cel.lular (DAPI) amb dos senyals vermells (Cy3) corresponents al cromosoma X. Magnificació: 1000x.

Després de realitzar el FISH, es va fer un recompte dels nuclis XX i XY d'una secció de cadascun dels pàncrees en pacients amb DT1 i controls en un microscopi de fluorescència. Es van tenir en compte només nuclis no solapats (700-2100 cèl.lules per mostra). L'eficiència de la tècnica (nuclis amb doble senyal respecte el total de nuclis comptats) va ser superior al 50% en tots els casos. La freqüència de cèl.lules maternes (MMcs) en els pàncrees de pacients amb DT1 va ser superior a la dels controls analitzats. No es va poder aplicar un anàlisi estadística degut al baix nombre de mostres controls. Tot i així en l'actualitat s'està ampliant el nombre de mostres i les dades concorden amb la tendència indicada. Els resultats es mostren a la **Taula 16**:

Taula 16. Freqüència de MMc en pàncrees

Cas	nuclis X	nuclis Y	nuclis XY	nuclis XX	nuclis YY	nuclis sense senyal	total de nuclis	freqüència de MMcs (%)	eficiència de FISH (%)
DT1 Cas 2	177	130	681	7	1	98	1094	0,639	62,98
DT1 Cas 3	125	70	496	5	2	28	726	0,689	69,28
DT1 Cas 4	419	265	1681	16	0	210	2591	0,618	65,50
Control 2	381	283	1217	4	2	222	2109	0,190	57,99
Control 4	215	119	732	5	0	135	1206	0,414	61,11

Ocasionalment es podrien observar cèl.lules poliploides resultants d'una fusió cel.lular o d'una no disjunció. Per descartar aquest fet en les cèl.lules XX observades, es van analitzar les mostres mitjançant microscopia confocal, obtenint imatges seriadades de plans consecutius de nuclis amb dos cromosomes X per descartar la presència d'un cromosoma Y en un pla diferent de l'observat. En cap de les cèl.lules observades mitjançant microscopia confocal es van detectar altres cromosomes, excloent una possible fusió o no-disjunció. A continuació es mostra un exemple representatiu d'imatges seriadades on s'observa una cèl.lula amb dos cromosomes X en plans consecutius (**Figura 25**). Un muntatge en format vídeo d'aquestes imatges seriadades s'ha inclòs com a material suplementari en format digital. En aquest cas (i en tots els analitzats) no es va observar cap tercer cromosoma addicional, descartant així una possible fusió o no-disjunció.

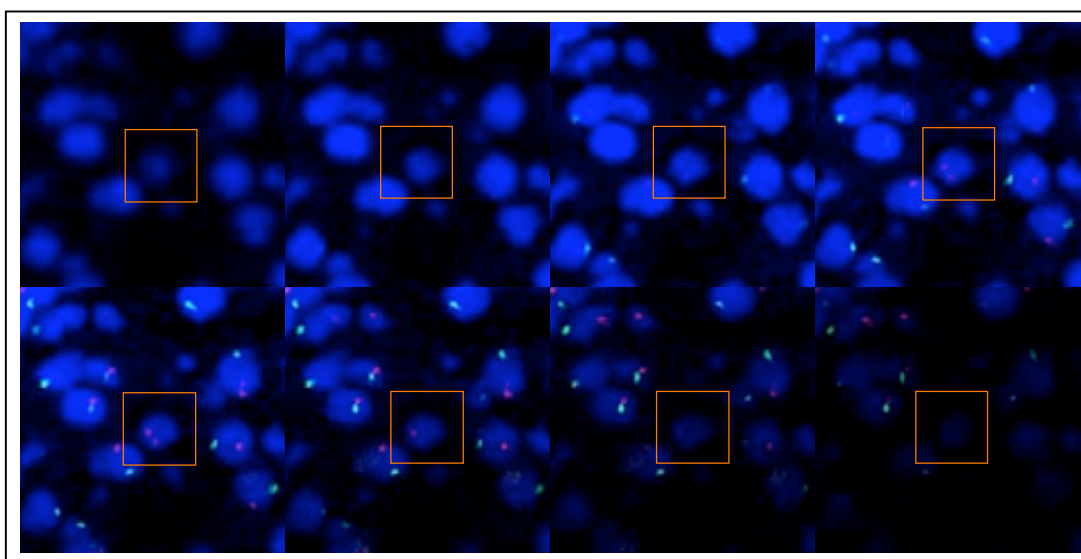


Figura 25. Cèl.lula pancreàtica d'origen matern en plans consecutius. Imatges seriadades obtingudes mitjançant microscopia confocal d'un nucli amb dos cromosomes X en el qual no s'observa cap cromosoma addicional.

En quant a la distribució de les cèl.lules maternes, ocasionalment es van trobar grups de 2-4 cèl.lules amb dos cromosomes X en situades a molt poca distància entre elles en els pàncrees dels casos 2 i 4. Aquesta distribució suggereix que les cèl.lules maternes podrien haver-se replicat o haver estat reclutades cap a la mateixa zona del teixit (**Figura 26**):

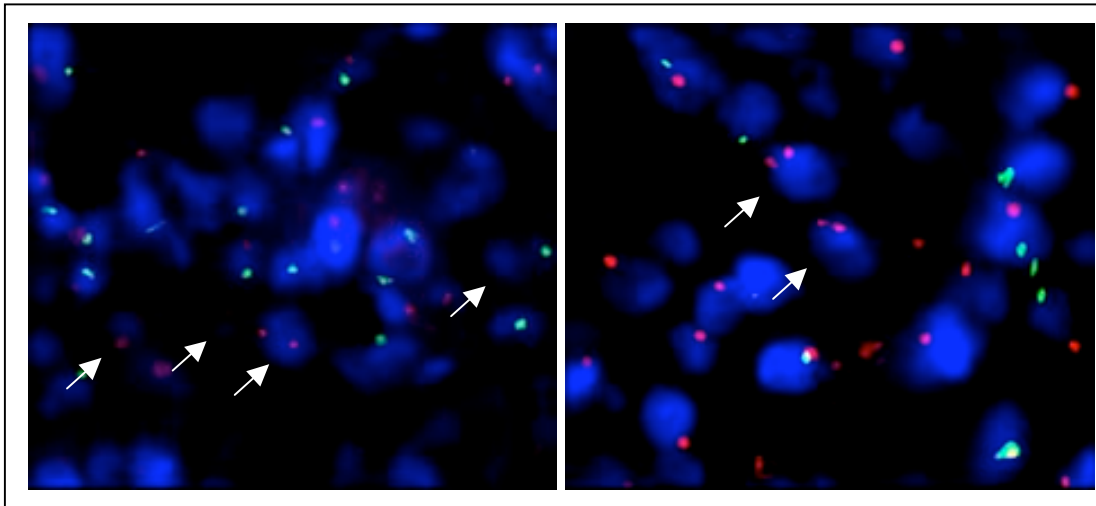


Figura 26. Agrupacions de cèl.lules d'origen matern. Imatges resultants de FISH en pàncrees dels casos 2 (esquerra) i 4 (dreta). En la imatge de l'esquerra s'observen tres nuclis XX adjacents i quart situat en el mateix camp. En la imatge de la dreta s'assenyalen dos nuclis XX situats de forma adjacent. Magnificació: 1000x.

2.2. CÈL.LULES β D'ORIGEN MATERN

Per detectar les cèl.lules β materns es va aplicar la tècnica de FISH en combinació amb la immunofluorescència indirecta amb un anticòs anti-insulina. En les seccions dels pàncrees de pacients amb DT1 estudiades no es van trobar cèl.lules amb un marcatge positiu clar per insulina, donat que la seva presència és quasi residual. Per tant, el recompte de cèl.lules β d'origen matern es va fer en pàncrees control. Es van poder observar cèl.lules β amb dos cromosomes X. A la **Figura 27** se'n mostren dos exemples:

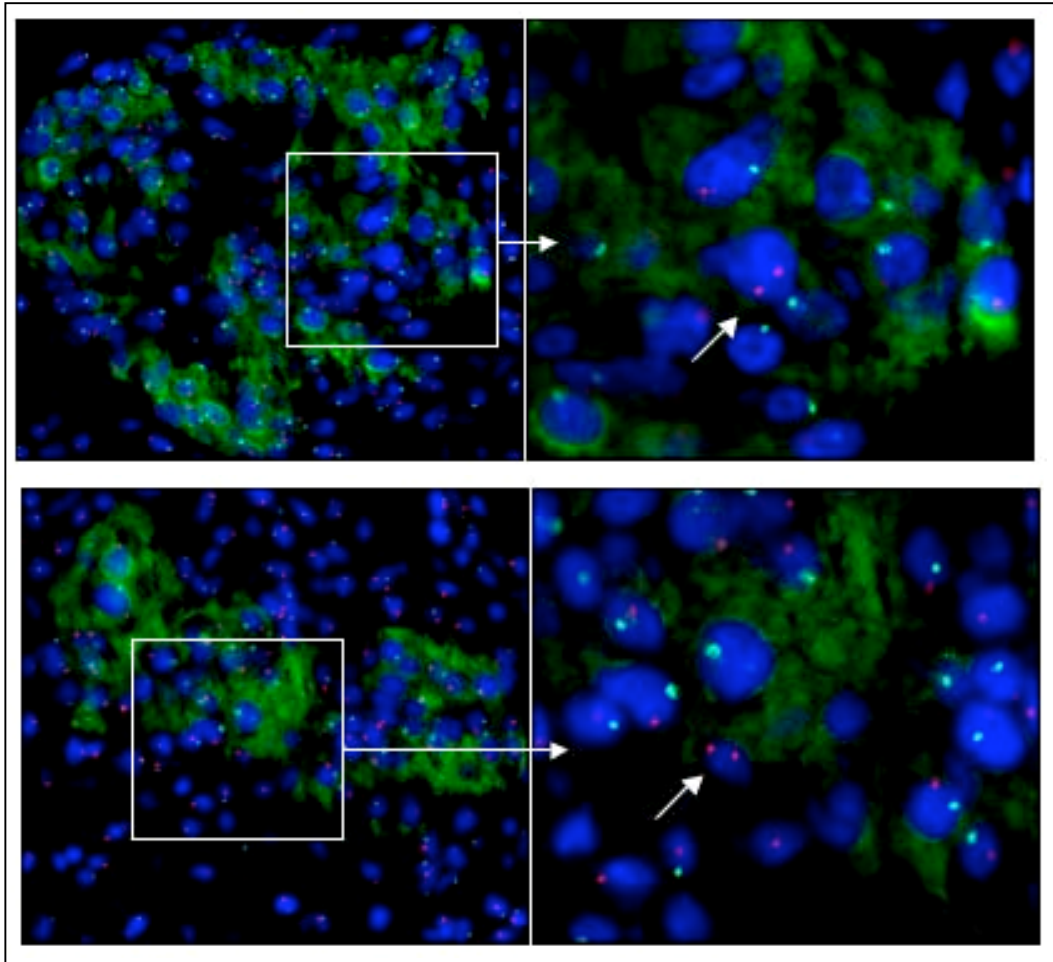


Figura 27. Presència de cèl.lules β maternes. FISH i immunofluorescència concomitant per insulina en una secció de pàncrees control (Control 2). S'observen dos illots pancreàtics amb un marcatge positiu per insulina (verd). En tots dos illots es mostra una cèl.lula β amb dos cromosomes X, mostrada a major augment en la imatge de la dreta respectiva (imatges de l'esquerra, 400x; imatges de la dreta, 1000x).

El recompte de MMcs en el total de cèl.lules (β i no β) d'una secció d'aquest pàncrees (Control 2) va indicar que el 0,28% del total de cèl.lules analitzades eren d'origen matern. Aquest resultat concorda amb el 0,19% de cèl.lules maternes observat en una altra secció de pàncrees de la mateixa mostra (**Taula 8**). Quan el recompte es va fer només en la població de cèl.lules β , un 1,33% van resultar ser d'origen matern (22 illots), indicant un enriquiment de les cèl.lules maternes en la població de cèl.lules β en aquesta mostra.

3. MEDIADORS DE LA RESPOSTA AUTOIMMUNITÀRIA A L'ÒRGAN DIANA EN LA DT1 EXPERIMENTAL

El model NOD RIP-IFN β és un model experimental de DT1 autoimmunitària agressiva, on l'IFN β promou la inflamació (insulitis) i l'atac autoimmunitari i accelera l'aparició de la malaltia (> 3 setmanes) respecte la soca d'origen NOD (> 14 setmanes). En ratolins NOD transgènics de nou setmanes d'edat, la insulitis augmenta fins a nivells equivalents als de ratolins diabètics [164]. En un experiment preliminar (no mostrat), es va analitzar el transcriptoma dels illots pancreàtics en fase d'insulitis avançada en el model NOD RIP-IFN β en comparació amb ratolins NOD. Aquesta anàlisi va determinar que als illots de ratolins NOD, l'expressió transgènica de la citocina antiviral produïa un augment en l'expressió de gens de presentació antigènica, complement, integrines, gens de resposta a IFNs i quimiocines. D'aquests grups, ens vam centrar en l'expressió de quimiocines (i d'altres citocines), com s'explica a continuació.

3.1. CITOCINES I QUIMIOCINES EN LA DT1 EXPERIMENTAL MEDIADA PER IFN β

Les citocines són molècules solubles del sistema immunitari amb múltiples funcions, com per exemple la modulació del tipus de resposta immunitària (Th1, Th2, Th17, Treg, Th9). Un subgrup d'aquestes, les quimiocines, són pèptids del sistema immunitari que tenen la capacitat d'atraure leucòcits al teixit diana d'una resposta immunitària favor del seu gradient de concentració. Comparant dos models murins de DT1, vam detectar un augment en l'expressió gènica de *Cxcl10* i *Ccl5* en illots de ratolins NOD RIP-IFN β sans de nou setmanes d'edat respecte ratolins NOD sans de la mateixa edat, mitjançant una primera anàlisi del transcriptoma (resultats no mostrats). *Cxcl10* és quimioatrant de limfòcits T, cèl.lules NK i monòcits, i *Ccl5* atrau diferents leucòcits però principalment limfòcits T. A partir d'aquests resultats, es va analitzar l'expressió de *Cxcl10* i *Ccl5* a la insulitis de ratolins diabètics, comparant la diabetis accelerada respecte la diabetis d'inici en edat adulta. Per això, es van obtenir mostres de teixit d'illots de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β diabètics mitjançant microdissecció làser de seccions pancreàtiques, en col.laboració amb el grup de la Dra. E. Tolosa (Universitat de Tübingen, Alemanya). L'expressió gènica de *Cxcl10* i *Ccl5* en aquestes mostres s'observa a la **Figura 28**:

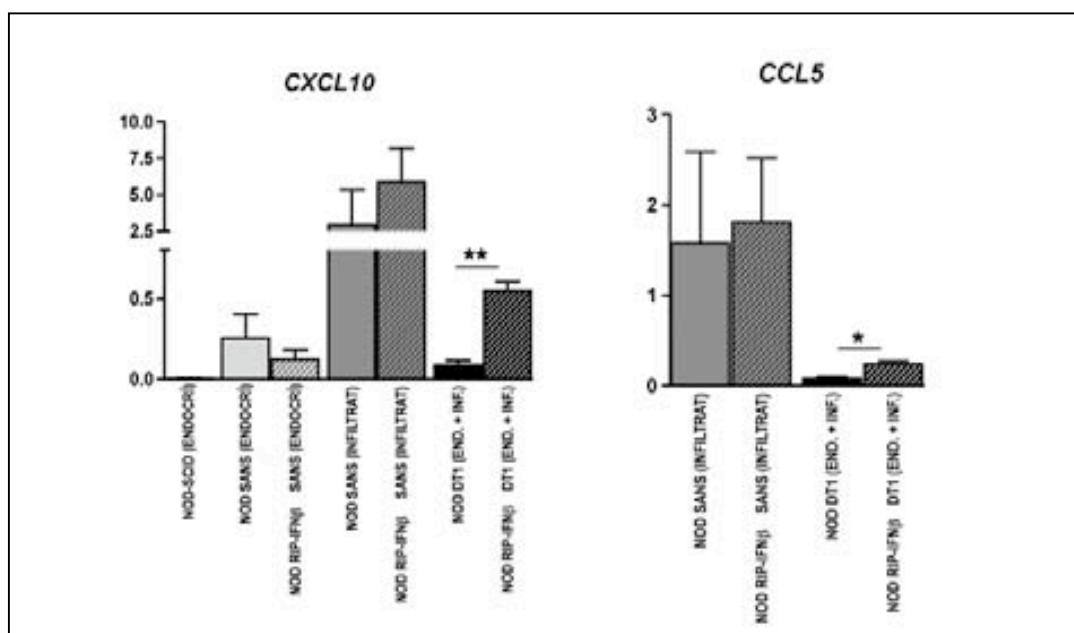


Figura 28. Augment de l'expressió gènica de *Cxcl10* i *Ccl5* en la insulinitis destructiva mediada per IFN β . Histogrames corresponents a l'anàlisi mitjançant qPCR de l'expressió *Cxcl10* i *Ccl5*, calculades de forma relativa a l'expressió de *18s* (gen d'expressió constitutiva) i una mostra calibradora (mitjana de les dades de NOD sans a l'infiltrat). Es van analitzar mostres de tres ratolins per condició: NOD.*Scid* de nou setmanes, NOD i NOD RIP-IFN β de nou setmanes i NOD i NOD RIP-IFN β a l'inici de la DT1. Les mostres corresponien a teixit (endocrí/infiltrat/endocrí+infiltrat) obtingut mitjançant microdissecció làser de blocs de pàncrees. La quantificació es va calcular segons el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm EEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Es va detectar un augment significatiu de l'expressió gènica de *Cxcl10* i *Ccl5* en la insulinitis destructiva mediada per IFN β . A partir d'aquests resultats es va decidir ampliar el panell de quimiocines, determinant l'expressió (proteica) de 32 citocines en pàncrees en els models NOD i NOD RIP-IFN β diabètics (inici clínic) mitjançant *arrays* de proteïna de baixa densitat (**Figura 29**). En pàncrees de ratolins NOD diabètics es va observar una predominància de citocines com IL-9, IL-12, IL-13, l'inhibidor de metal.lopeptidases de la matriu extracel.lular TIMP-1 i la trombopoietina, i de quimiocines com CCL2 (quimioatrait de monòcits) i CXCL2 (quimioatrait de granulòcits). En els ratolins NOD amb DT1 accelerada per IFN β es va detectar un augment significatiu d'algunes citocines en comparació amb el model NOD com IL-5, les subunitats p70 i p40 d'IL-12 (aquesta darrera comuna en IL-12 i en IL-23), IL-17 i G-CSF. Es va observar una tendència general d'augment d'expressió de citocines i quimiocines en pàncrees de ratolins amb DT1 accelerada per IFN β , en comparació amb la soca NOD. En pàncrees de ratolins NOD RIP-IFN β diabètics es va detectar un augment significatiu d'expressió de CCL27 (factor quimiotàctic de limfòcits T) i de CCL5 (validant en aquesta última els resultats a nivell de mRNA). Com a control, es va realitzar un experiment amb mostres pancreàtiques de ratolins C57BL6J, soca resistent a la DT1, resultant les 32 citocines per sota del límit de detecció. L'expressió de citocines i quimiocines en pàncrees en ratolins NOD i NOD RIP-IFN β diabètics es representen en forma d'histogrames a la **Figura 29**.

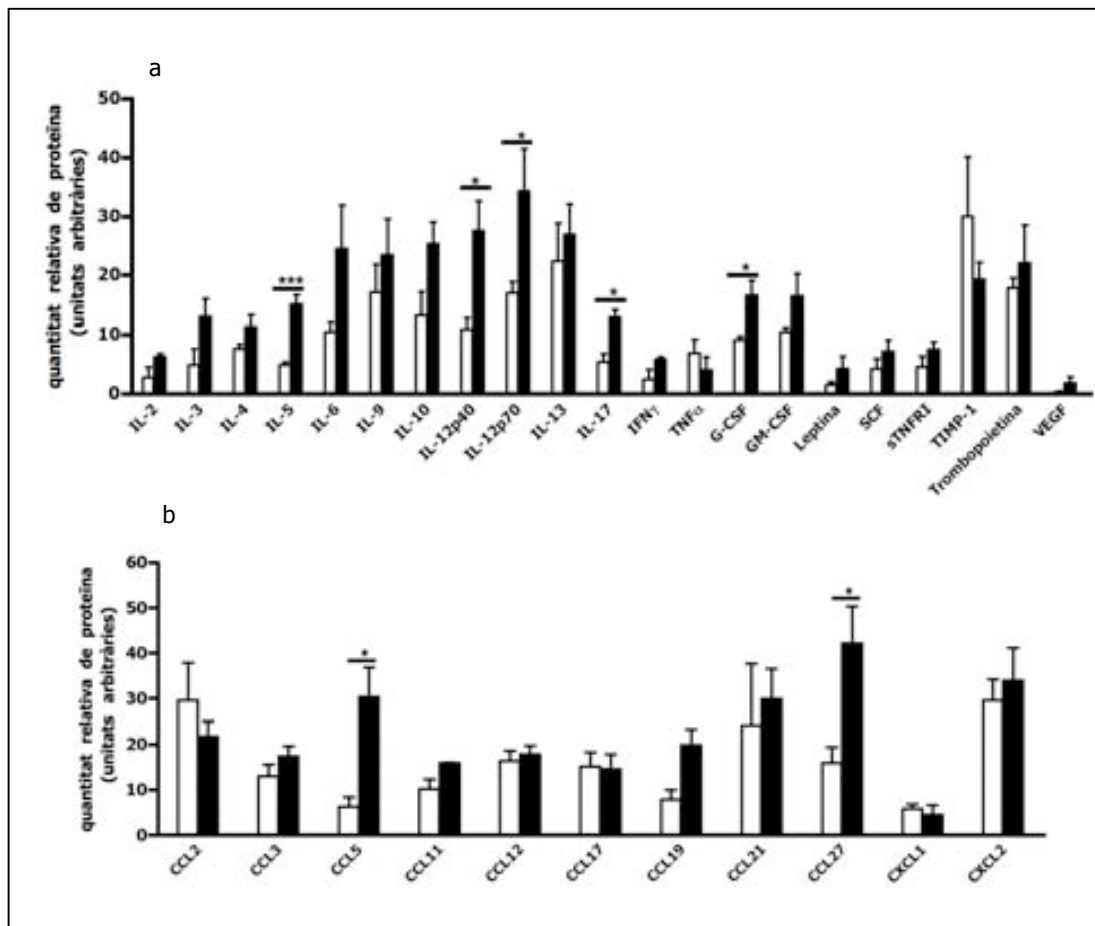


Figura 29. Quantificació de citocines (a) i quimiocines (b) en pàncrees de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β diabètics. Es van quantificar 32 citocines i quimiocines mitjançant *arrays* de proteïna de baixa densitat. En cada experiment es va analitzar un *pool* d'extractes proteics pancreàtics procedent de cinc ratolins NOD (barres blanques) o bé NOD RIP-IFN β (barres negres). Els resultats són la mitjana de tres experiments per condició. Els valors arbitraris d'expressió es van obtenir mitjançant densitometria; el valor obtingut per cada proteïna es va normalitzar respecte el valor mitjà dels controls positius menys el valor mitjà dels controls negatius. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

3.2. EFECTE DE L'IFN β EN L'EXPRESSIÓ DE GENS REG EN LA DT1 EXPERIMENTAL

Els gens de la família Reg s'han associat a la DT1 en el model NOD tant per les seves característiques com a factors de proliferació de cèl·lules β com pel ser paper com a possibles autoantígens. Com s'explica a continuació, vam estudiar el perfil d'expressió de gens de la família Reg als illots pancreàtics del model NOD RIP-IFN β .

3.2.1. Sobreexpressió de Reg2 als illots de ratolins NOD RIP-IFN β

Per determinar l'efecte de l'IFN β als illots del model NOD, es va comparar l'expressió gènica d'illots de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β . Es van analitzar illots de ratolins no diabètics de quatre setmanes d'edat (fase d'inici de la insulinitis en el model NOD) mitjançant *microarrays* de cDNA de baixa densitat. Les hibridacions es van realitzar per triplicat, amb quatre rèpliques de cada cDNA per *microarray* ($n=12$). Als illots dels ratolins NOD RIP-IFN β es va detectar una sobreexpressió de $\beta 2$ -microglobulina, gen prèviament descrit com a induïble per IFN β i per tant

control positiu dels canvis d'expressió ($\log_2FC=1,43$, $p<0,01$). També s'hi va detectar una forta inducció de *Reg2*, factor de regeneració de la família Reg ($\log_2FC=3,48$, $p<0,0001$). L'expressió d'insulina 1 va resultar disminuïda en comparació amb el model NOD ($\log_2FC=-0,47$, $p<0,0001$). La resta de marcadors d'illot i autoantígens (*Gad1*, *Gad2*, *G6pc2* (Igrp), glucagó, somatostatina i polipèptid pancreàtic) no van mostrar variacions d'expressió. A la **Taula 17** es resumeixen aquests resultats. Cal afegir que també es va comparar l'expressió gènica d'illots de ratolins NOD de 14 setmanes –no diabètics però amb insulinitis avançada- amb els de quatre setmanes de la mateixa soca –inici de la insulinitis-. En aquest cas, no es van detectar canvis en l'expressió gènica de *Reg2* (dades no mostrades).

Taula 17. Gens diferencialment expressats en illots de ratolins NOD RIP-IFN β en comparació amb illots de ratolins NOD.

Gene ID	Símbol	Log ₂ FC	p valor	Funció
19693	<i>Reg2</i>	3,48 ± 0,14	p<0,0001	Factor de proliferació β ; possible autoantigen en DT1
12010	<i>B2m</i>	1,43 ± 0,33	p<0,01	Presentació antigènica (MHC de classe I)
16333	<i>Ins1</i>	0,47 ± 0,07	p<0,0001	Hormona reguladora del metabolisme de la glucosa; autoantigen en DT1

ID: identificador;

La sobreexpressió de *Reg2* en illots purificats del model transgènic va ser validada mitjançant qPCR. A més, es va ampliar l'anàlisi incloent el gen *Reg1* i mostres d'illots de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β diabètics obtingudes mitjançant microdissecció làser. En ratolins sans de quatre setmanes no es van detectar variacions significatives en l'expressió de *Reg1* en illots entre els dos models. En canvi, es va confirmar l'augment d'expressió de *Reg2* en els illots del model transgènic (augment d'expressió de 3,5 vegades, expressió relativa) en comparació amb ratolins NOD ($p<0,001$), tal com s'observa a la **Figura 30**:

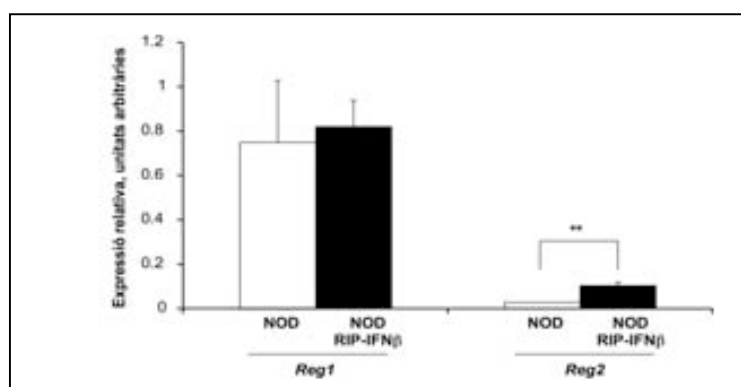


Figura 30. Expressió gènica de *Reg1* i *Reg2* en illots de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β no diabètics de 4 setmanes d'edat. Histogrames corresponents a l'anàlisi mitjançant qPCR de l'expressió *Reg1* i *Reg2*, calculades de forma relativa a l'expressió de *GAPDH* (gen d'expressió constitutiva) i una mostra calibradora (pool d'illots de ratolins NOD.*Scid*). Es van analitzar mostres de tres ratolins de quatre setmanes d'edat per condició. La quantificació es va calcular segons el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm EEM ** $p<0,01$.

En ratolins diabètics es va determinar l'expressió insular relativa de *Reg1*, *Reg2* i *Ins1* en referència a 18S (*Rn18S*) com a gen calibrador. Tal com s'observa a la **Figura 31**, l'expressió de *Reg2* en ratolins NOD RIP-IFN β diabètics va resultar 14,1 vegades superior a la de ratolins diabètics de la soca salvatge NOD, $p < 0,05$. En quant a *Reg1*, també es va observar una tendència a la sobreexpressió en illots del model transgènic (3,4 vegades), però sense diferències significatives. A més, en el model de DT1 mediada per IFN β es va observar que l'expressió gènica d'*Ins1* als illots era 10,1 vegades major que en model NOD en les mateixes condicions.

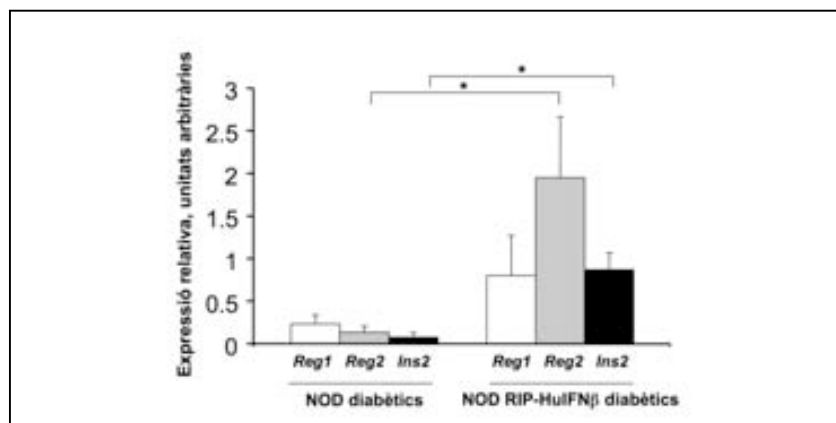


Figura 31 Expressió gènica de *Reg1*, *Reg2* i *Ins2* en illots de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β diabètics. Histogrames corresponents a l'anàlisi mitjançant qPCR de l'expressió *Reg1* (blanc), *Reg2* (gris), i *Ins2* (negre) calculades de forma relativa a l'expressió de 18s (gen d'expressió constitutiva) i una mostra calibradora (pool de cDNAs d'illots de ratolins *NOD.Scid*). Les mostres d'illots de ratolins diabètics es van obtenir mitjançant microdissecció làser de l'àrea endocrina de crioseccions de pàncrees. Es van analitzar mostres de tres ratolins diabètics per condició. La quantificació es va calcular segons el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm EEM * $p < 0,05$.

3.2.2. Anàlisi histològica de l'expressió insular de Reg

Per confirmar l'augment d'expressió de Reg en el model de DT1 accelerada a nivell de proteïna es va realitzar un estudi immunohistològic de l'expressió de Reg1 i Reg2 en illots del model transgènic i la soca salvatge a les quatre setmanes d'edat. Es van analitzar tres ratolins per cada condició. A la **Figura 32** se'n mostren imatges representatives.

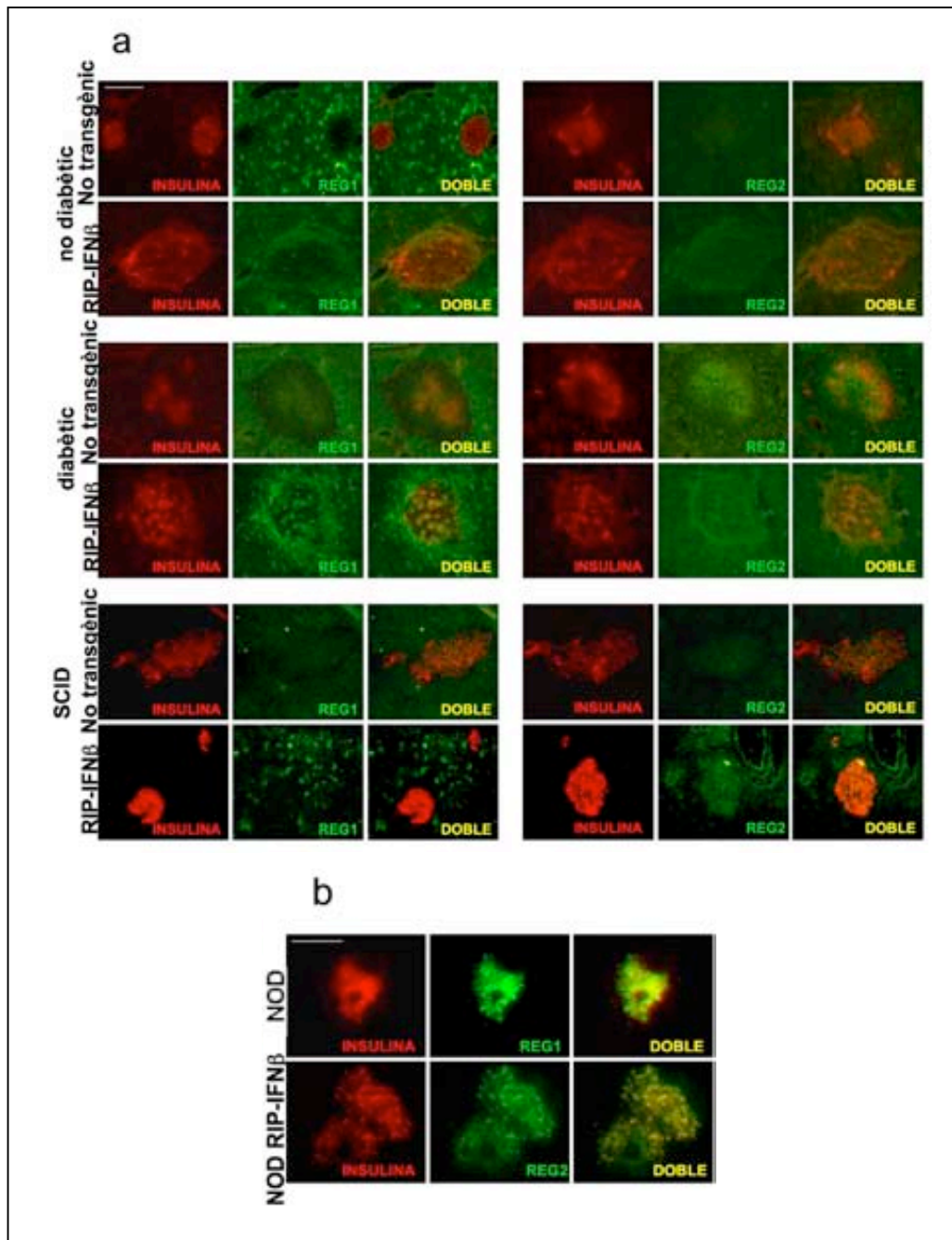


Figura 32. Anàlisi immunohistològica de l'expressió de Reg1 i Reg2 en illots de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β . **a**, imatges de seccions pancreàtiques: el panell de l'esquerra correspon a Reg 1 i el de la dreta correspon a Reg2. Les imatges corresponen, de dalt a baix, a ratolins NOD no diabètics (no transgènics i transgènics), ratolins NOD diabètics (no transgènics i transgènics) i ratolins NOD.*Scid* (no transgènics i transgènics). Com a marcador d'illot es va utilitzar la insulina. Magnificació: 200x. La barra horitzontal correspon a 100 μ m. **b**, imatges de cèl.lules endocrines procedents d'illots disgregats de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β no diabètics. Magnificació: 1000x. La barra horitzontal correspon a 25 μ m.

Com es pot observar, no es va detectar Reg1 als illots de ratolins NOD sans, però sí en illots de ratolins NOD RIP-IFN β , de forma més marcada a les cèl.lules endocrines de la perifèria (marcatge positiu per insulina i negatiu pel marcador neuronal GFAP, resultats no mostrats) . En el cas de Reg2 es va confirmar l'augment observat mitjançant *microarrays* en el model

transgènic. En illots de ratolins NOD de 14 setmanes no diabètics però en fase d'insulinitis avançada tampoc es va detectar sobreexpressió de Reg, dada que correlaciona també amb resultats dels *microarrays* (dades no mostrades). En els ratolins NOD RIP-IFN β diabètics, Reg1 i Reg2 es van observar sobreexpressats als illots i expressats en algunes cèl.lules de l'exocrí properes als illots pancreàtics. Per estudiar l'efecte de l' IFN β en un model lliure d'insulinitis es van analitzar illots de ratolins immunodeficients NOD.*Scid* i NOD.*Scid* RIP-IFN β . Com s'observa a la **Figura 32** en els illots del model transgènic en fons genètic NOD.SCID es va detectar una sobreexpressió de Reg2, però no de Reg1.

Per confirmar l'expressió de Reg1 i Reg2 en cèl.lules β , es van obtenir suspensions de cèl.lules endocrines individuals adherides a un portaobjectes (citospins) mitjançant la disgregació d'illots pancreàtics de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β no diabètics. Com es reflexa a la **Figura 32**, la tinció de Reg1 i Reg2 co-localitzava amb la d'insulina, indicant l'expressió de Reg en cèl.lules β .

3.2.3. Efecte de la insulinitis en la sobreexpressió de Reg als illots del model RIP-IFN β

La inflamació és un dels factors descrits que pot modular l'expressió dels gens de la família Reg. Es va voler estudiar si l'augment de Reg observat als illots del model RIP-IFN β era simplement degut a que aquest model presentés un major grau d'inflamació local als illots. Es va comparar l'índex d'insulinitis de ratolins NOD i NOD RIP-IFN β (no diabètics) en les fases de progressió de la malaltia analitzades mitjançant *microarrays*, com es representa a la **Figura 33**.

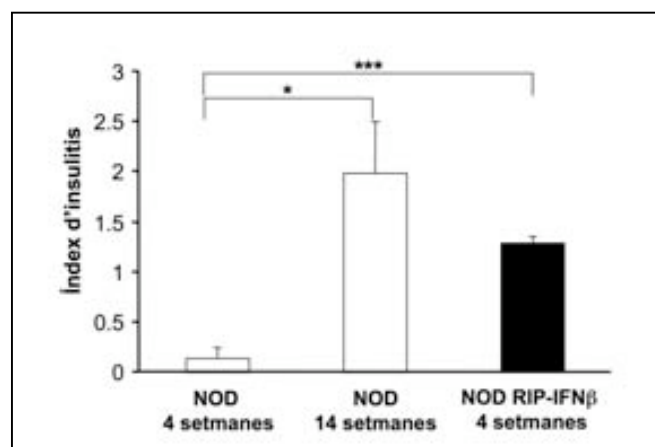


Figura 33. Índex d'insulinitis en ratolins NOD i NOD RIP-IFN β . Índex de la insulinitis corresponent a illots de ratolins NOD de 4 i 14 setmanes (barres blanques) i ratolins NOD RIP-IFN β no diabètics, condicions analitzades mitjançant *microarrays* de cDNA. Es van analitzar com a mínim 20 illots per animal en 3-6 animals per condició. Els resultats estan expressats com a mitjana \pm EEM. * p <0,05, *** p <0,001.

L'índex d'insulinitis dels ratolins NOD RIP-IFN β a les quatre setmanes d'edat va resultar significativament major que el dels ratolins NOD a la mateixa edat (p <0,001). Però l'índex d'insulinitis dels ratolins NOD a les 14 setmanes d'edat va resultar encara major, mostrant diferències significatives respecte ratolins NOD a les quatre setmanes (p <0,05). En illots de

ratolins NOD de 14 setmanes no es va observar sobreexpressió de *Reg* mitjançant *microarrays* o immunohistologia. Per tant, la inflamació per sí sola no explica la sobreexpressió de *Reg* en el model de DT1 accelerada per $\text{IFN}\beta$.

3.2.4. Efecte directe de l' $\text{IFN}\beta$ la sobreexpressió de *Reg*

Per definir un possible efecte directe de l' $\text{IFN}\beta$ en la regulació de l'expressió de *Reg*, es realitzar dos tipus d'anàlisi mitjançant qPCR: un va ser la comparació de l'expressió gènica de *Reg* entre illots de ratolins de les soques NOD.*Scid* i NOD.*Scid* RIP- $\text{IFN}\beta$ (immunodeficients i lliures d'insulinitis). L'altre va ser l'anàlisi d'expressió gènica de *Reg* de la línia cel.lular β murina NIT-1 després de ser exposada a $\text{IFN}\beta$ humà. Inicialment, com a control de l'efecte de la citocina, es va comprovar que l' $\text{IFN}\beta$ humà fós capaç d'induir un augment d'expressió de MHC de classe I en la línia cel.lular murina NIT-1 a la dosi testada (50000 U/ml), ja que la citocina humana té un efecte 1000 vegades menor sobre el receptor murí que la citocina murina. Es va comprovar la inducció d'expressió de MHC de classe I en superfície en totes les mostres analitzades, per citometria de flux, amb valors d'intensitat de fluorescència de $439,4 \pm 43$ en les cèl.lules exposades i $100,2 \pm 19,6$ en cèl.lules en condicions basals (mediana \pm desviació estàndard), ($p < 0,001$) (**Figura 34**).

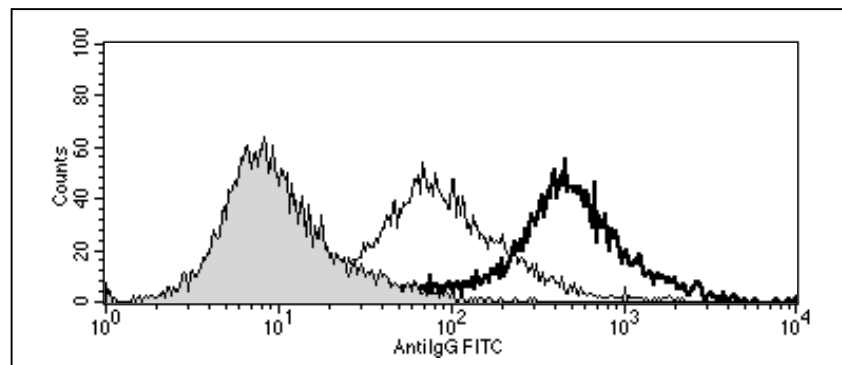


Figura 34: Inducció de MHC I per $\text{IFN}\beta$ humà en la línia cel.lular murina NIT-1, detectada mitjançant citometria de flux. la mediana de la intensitat de fluorescència indicadora de MHC I va resultar significativament superior en les cèl.lules estimulades amb $\text{HuIFN}\beta$ (línia gruixuda) ($439,45 \pm 86,03$) respecte les basals (línia fina) ($100,21 \pm 39,29$) ($P < 0,001$) L'àrea gris correspon al control d'isotip. Experiment representatiu d'un total de quatre.

Com s'observa a la **Figura 35**, els illots de ratolins NOD.*Scid* RIP- $\text{IFN}\beta$ van mostrar un augment (no significatiu) d'expressió de *Reg2* en comparació amb la soca immunodeficient no transgènica. L'expressió de *Reg1* no va mostrar variacions. Aquests resultats correlacionen amb l'anàlisi immunohistològica. En canvi, l'expressió de *Reg1* i *Reg2* en la línia cel.lular β NIT-1 exposada a $\text{IFN}\beta$ va resultar significativament augmentada respecte cèl.lules en condicions basals (*Reg1*: expressió 3,9 vegades major, $p < 0,05$; *Reg2*: expressió 5,48 vegades major, $p < 0,001$). L' $\text{IFN}\beta$, per tant, va resultar tenir un efecte en la modulació de l'expressió gènica de *Reg1* i *Reg2* en cèl.lules β .

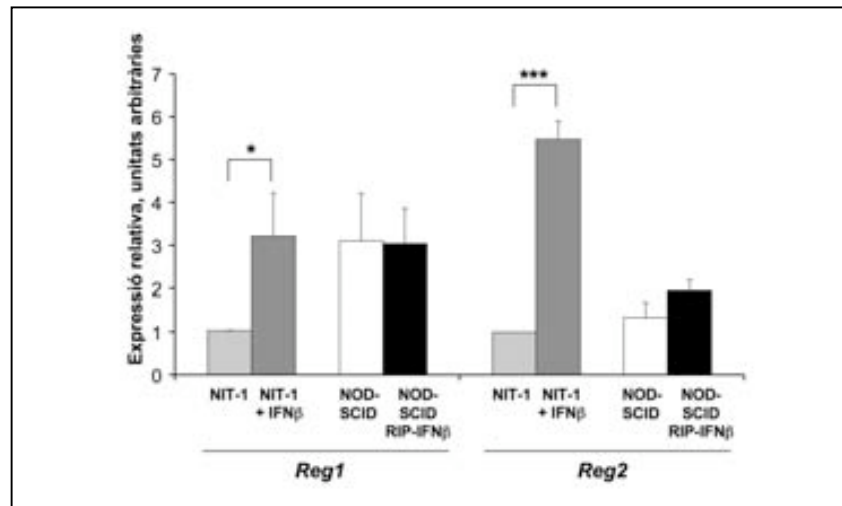


Figura 35. Efecte de l'IFN β en l'expressió gènica de *Reg1* i *Reg2* en illots de ratolins NOD.*Scid* i en la línia cel.lular NIT-1. Histogrames corresponents a l'expressió de *Reg1* i *Reg2*, en cèl.lules NIT-1 en condicions basals (barres gris clar) i cèl.lules NIT-1 exposades a IFN β durant 72h (barres gris fosc), illots de ratolins NOD.*Scid* (barres blanques) i NOD.*Scid* RIP-IFN β (barres negres) de quatre setmanes. L'expressió de Reg es va calcular de forma relativa a l'expressió de *GAPDH* (gen d'expressió constitutiva) i una mostra calibradora (cèl.lules NIT-1 en condicions basals / pool d'illots de ratolins NOD.*SCID*). Es van analitzar mostres de tres ratolins de quatre setmanes d'edat per condició i mostres de quatre experiments d'exposició de cèl.lules NIT-1 a IFN β . La quantificació es va calcular segons el mètode $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

3.2.5. Correlació de la inducció de Reg amb l'augment d'expressió d'IL-6

S'ha descrit que la citocina proinflamatòria IL-6 actua sobre el promotor dels gens Reg, induint-ne l'expressió gènica. Es va voler estudiar si l'augment de Reg mediat per IFN β podria estar associat a un augment d'IL-6. Es va determinar l'expressió gènica d'*Il6* en illots de ratolins NOD, NOD RIP-IFN β , NOD.*Scid*, NOD.*Scid* RIP-IFN β i cèl.lules NIT-1 exposades a IFN β mitjançant qPCR, tal com s'observa a la **Figura 36**.

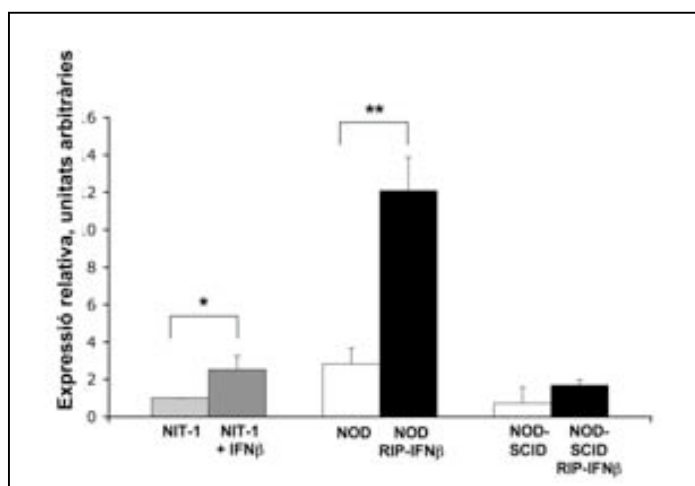


Figura 36. Efecte de l'IFN β en l'expressió gènica d'Il6 en la insulitis i en cèl.lules β . Histogrames de l'anàlisi mitjançant qPCR de l'expressió d'Il6, en cèl.lules NIT-1 en condicions basals (barres gris clar) i cèl.lules NIT-1 exposades a IFN β durant 72h (barres gris fosc), illots de ratolins NOD i NOD.Scid (barres blanques) i illots de ratolins transgènics NOD RIP-IFN β i NOD.Scid RIP-IFN β (barres negres) de quatre setmanes. L'expressió d'Il6 es va calcular de forma relativa a l'expressió de GAPDH (gen d'expressió constitutiva) i una mostra calibradora (cèl.lules NIT-1 en condicions basals / pool d'illots de ratolins NOD.Scid). Es van analitzar mostres de tres ratolins de quatre setmanes d'edat per condició i mostres de quatre experiments d'exposició de cèl.lules NIT-1 a IFN β . La quantificació es va calcular segons el mètode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

En illots de ratolins NOD RIP-IFN β sans de quatre setmanes, l'expressió d'Il6 va resultar ser major ($12,1 \pm 1,8$) que en ratolins NOD ($2,8 \pm 0,8$) ($p < 0,001$). En el model transgènic sense insulitis NOD.Scid RIP-IFN β es va observar una tendència incrementar l'expressió d'Il6 respecte la soca NOD.Scid, però sense ser significativa. En la línia cel.lular NIT-1 sí es va detectar un augment transcripcional significatiu d'Il6 després d'exposar-la a IFN β : l'expressió va resultar 2,5 vegades major que en condicions basals ($p < 0,05$). A nivell de proteïna, també es va observar un augment d'IL-6 (tot i que no significatiu) en pàncrees de ratolins NOD transgènics diabètics en comparació a ratolins NOD no transgènics diabètics, tal com s'ha mostrat anteriorment a la **Figura 29**.

3.2.6. Correlació de Reg2 amb una hiperplàsia insular en el model transgènic

Reg és una família de factors de proliferació de cèl.lules β que s'expressa, entre d'altres localitzacions, en illots pancreàtics en processos de regeneració. Com a mesura indirecta, es va intentar establir una associació entre la sobreexpressió de Reg2 i l'augment de la massa dels illots, es va mesurar l'àrea mitjana dels illots els fons genètics NOD, NOD.Scid i CD-1. En tots tres casos, es va observar un augment significatiu de l'àrea insular en el model transgènic respecte la soca salvatge: $18356 \pm 755 \mu\text{m}^2$ vs $13717 \pm 1532 \mu\text{m}^2$ en fons genètic NOD ($p < 0,05$), $17321 \pm 770 \mu\text{m}^2$ vs $12686 \pm 543 \mu\text{m}^2$ en fons genètic CD-1 ($p < 0,01$) i $17315 \pm 1354 \mu\text{m}^2$ vs $14304 \pm 1139 \mu\text{m}^2$ en fons genètic NOD.Scid ($p < 0,01$). A més, es van agrupar els illots en rangs de diferents àrees, i es va observar que en els models transgènics RIP-IFN β hi havia un menor percentatge d'illots corresponents als rangs de menor àrea ($< 10000 \mu\text{m}^2$) i major percentatge

corresponents al rang de major àrea ($>20000 \mu\text{m}^2$). Els resultats d'aquesta anàlisi morfològica es mostren a la **Figura 37**.

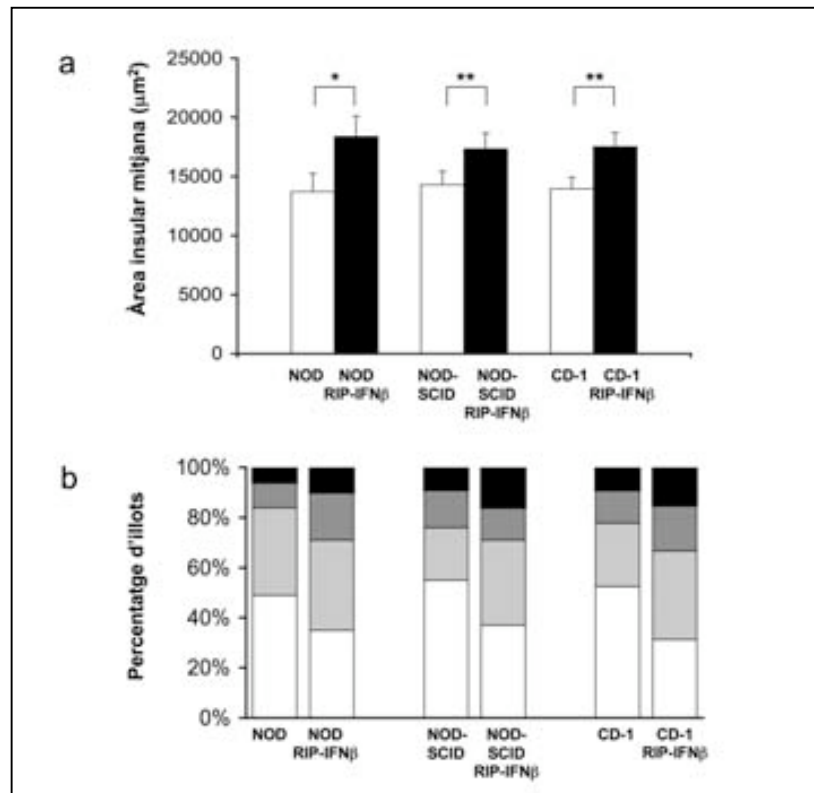


Figura 37. Hiperplàsia insular en el model transgènic RIP-IFN β observada mitjançant un anàlisi morfològic. **a**, histogrames representant l'àrea mitjana dels illots del model transgènic RIP-IFN β (barres negres) i en el model no transgènic amb el fons genètic equivalent (barres blanques). L'àrea (μm^2) es va mesurar en un mínim de 20 illots per animal i tres animals per condició a les quatre setmanes d'edat en seccions de pàncrees tenyides amb H&E. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. **b**, Percentatge d'illots (corresponents a l'anàlisi referida a la **Figura 36a**) agrupats en rangs segons la seva àrea: 0-10000 μm^2 (fracció blanca), 10000-20000 μm^2 (fracció gris clar), 20000-30000 μm^2 (fracció gris fosc) i >30000 μm^2 (fracció negra).

Resultats addicionals del nostre grup van demostrar que la hiperplàsia insular era deguda a un major nombre de cèl.lules β per illot en el model transgènic, i no a un augment en la mida de les cèl.lules β ni a una major densitat de cèl.lules β per illot. També es va comprovar que, malgrat la hiperplàsia cel.lular, el model transgènic no mostrava alteracions metabòliques.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

1. EL TRANSCRIPTOMA DEL TEIXIT DIANA REVELA L'ABAST I LA COMPLEXITAT DE LA RESPOSTA AUTOIMMUNITÀRIA EN LA DT1 HUMANA

Els processos moleculars mitjançant els quals el sistema immunitari destrueix les cèl·lules β dels illots pancreàtics en la DT1 encara no estan ben definits. A diferència d'altres malalties autoimmunitàries, existeix una dificultat evident per accedir al teixit patològic en pacients, especialment en l'inici clínic, ja que els símptomes de la malaltia no solen causar mortalitat. A més, les biòpsies pancreàtiques impliquen un alt risc de pancreatitis i no són una pràctica habitual, a excepció del Japó [129]. Fins l'actualitat s'han descrit alteracions immunològiques als illots pancreàtics en pacients amb DT1 mitjançant estudis histològics d'un nombre limitat de mostres de teixit fixat. Així per exemple, s'han constatat: la presència d'una insulitis lleu –a diferència de la insulitis prominent del model NOD- formada principalment per limfòcits T CD8⁺ i macròfags en la major part dels casos, la sobreexpressió de molècules d'HLA, molècules d'adhesió i citocines proinflamàtores i la presència en alguns casos de proteïnes d'enterovirus, entre d'altres alteracions [46, 63, 112, 121, 130-132]. Ocasionalment s'ha pogut detectar en donants d'òrgan ICA⁺ una insulitis amb característiques semblants a la dels pacients amb DT1 [279]. D'altres processos patogènics s'han extrapolat a partir de dades d'assaigs *in vitro* amb illots pancreàtics purificats [111, 280] i de models experimentals com el ratolí NOD [145]. Però en la DT1 humana manca una visió de conjunt dels mecanismes moleculars implicats en la patogènesi a l'òrgan diana. Una aproximació inicial podria aconseguir-se mitjançant tècniques que permetin anàlisis moleculars a gran escala [192].

En el nostre estudi s'analiza per primera vegada el perfil d'expressió gènica a l'òrgan diana de l'autoimmunitat de la DT1 en quatre pacients en diferents estadis de progressió de la malaltia. El Cas 1 correspon a un pacient en l'estadi d'inici clínic, només cinc dies després del diagnòstic. Aquest és un fet poc freqüent donat el descens de mortalitat associada a la simptomatologia de la DT1. El Cas 2 correspon a un pacient de nou mesos de progressió de la DT1, que probablement es trobés en una fase de remissió temporal de la malaltia, fase coneguda com a "lluna de mel". Aquesta suposició es basa en el temps d'evolució de la malaltia i en l'expressió gènica d'insulina determinada mitjançant qPCR, superior (tot i que no significativament) en el Cas 2 que en la resta de casos. La fase de "lluna de mel" té lloc durant els mesos següents de l'inici del tractament amb insulina exògena en el 70% de pacients amb DT1 segons un estudi recent [281]. Es creu que és una conseqüència derivada de l'inici del tractament, que fa que les cèl·lules β remanents deixin d'estar sotmeses a una situació de glucotoxicitat i recuperin la seva activitat secretora d'insulina. Recentment s'ha afirmat també que aquesta fase podria ser una resposta de tolerància enfront a la immunitat adaptativa, que

es donaria de forma recurrent-remitent al llarg de la progressió de la malaltia, però seria més evident a l'inici clínic al ser més prominent la destrucció β [282]. L'estudi de la resposta autoimmunitària durant la fase de "lluna de mel" pot ser rellevant, ja que aquest podria ser un estadi identificable i més sensible a possibles immunoteràpies tolerogèniques. Els casos 3 i 4 corresponen a pacients en fase crònica, aproximadament una dècada després del diagnòstic. Aquest és un estadi molt menys caracteritzat que les fases d'inici de la malaltia, ja que generalment s'havia considerat que l'atac autoimmunitari en la DT1 era un procés agut que s'extingia, paral·lelament a la desaparició de les cèl·lules β . En tots quatre casos analitzats, l'infiltrat leucocitari dels illots va mostrar una composició coincident amb la major part dels casos de DT1 humana descrits [109, 112, 121, 130]. Això, juntament amb la presència d'haplotips d'HLA de risc, reforça la representativitat dels casos analitzats. Un dels avantatges de la nostra col·lecció de mostres de pàncrees és que es tracta de teixit congelat, a diferència de la majoria de casos estudiats per d'altres autors. Aquest fet ens va permetre obtenir-ne un RNA amb integritat òptima, necessària per poder realitzar estudis d'expressió gènica mitjançant *microarrays*. En l'anàlisi de l'expressió gènica dels illots purificats cal tenir en compte la possible pèrdua de mRNAs corresponents a àrees de peri-insulitis, degut a la digestió enzimàtica durant el procés d'aïllament. A més, cal considerar la presència d'alteracions immunològiques rellevants al teixit exocrí. Per això és interessant la visió complementària obtinguda en paral·lel del perfil d'expressió d'illots purificats i de pàncrees total que aporta la nostra anàlisi en dos dels casos. Les característiques de les mostres analitzades ens fan pensar que, malgrat ser una col·lecció petita, les alteracions del transcriptoma identificades aportaran informació nova i rellevant.

Els perfils d'expressió identificats reflecteixen alteracions ja descrites i posen de manifest la importància d'altres vies menys explorades en la DT1 humana. Una de les primeres alteracions immunològiques descrites en la DT1 fa referència a l'expressió de molècules d'HLA. L'augment d'HLA de classe I als illots ha estat àmpliament demostrat [46, 112, 129, 130], així com l'expressió d'HLA de classe II per part de leucòcits infiltrants, cèl·lules endotelials [130] i ocasionalment de cèl·lules β [46, 112], en les quals l'expressió és induïble per citocines proinflamàtores [111]. Concordant amb aquests estudis, en els casos analitzats vam detectar un perfil de sobreexpressió de gens d'HLA tant de classe I com de classe II al pàncrees en fases d'inici i crònica, juntament amb d'altres gens que formen part de les vies de processament i presentació antigènica. En illots purificats dels pacients vam detectar un augment ocasional de gens d'HLA i una sobreexpressió de *PRSS16*, una serina proteasa recentment associada a la DT1 en estudis genètics [283], expressada en cèl·lules epitelials tímiques i relacionada amb l'expressió de pèptid-MHC II propi i la selecció positiva de limfòcits T CD4⁺ [284]. La sobreexpressió de *PRSS16* als illots suggereix que aquesta proteasa del timus podria col·laborar en la presentació per MHC de classe II al teixit diana de l'autoimmunitat. El perfil descrit indica que als illots es dona un procés actiu de processament antigènic en diferents fases de la malaltia, o bé a través de les pròpies cèl·lules β o d'APCs intraillot [285]. Tot i així, no es va

detectar inducció de molècules co-estimuladores a l'òrgan diana, fet que podria ser degut o bé a limitacions tècniques o bé en estar en concordància amb la hipòtesi que afirma que la presentació completa d'autoantígens insulars es dona principalment en òrgans limfoides secundaris [105, 110]. En aquest sentit, la respostes a moltes preguntes serien contestables mitjançant l'anàlisi del perfil d'expressió del pLN en la DT1 humana.

La DT1 és una malaltia mediada per limfòcits T autoreactius. Els limfòcits T CD8⁺ són la població predominant en la insulitis en pacients en la majoria de casos descrits, i es consideren els responsables principals de la citotoxicitat de les cèl.lules β ; la seva capacitat citolítica contra les cèl.lules β de forma antígen-específica ha estat demostrada [106]. Els limfòcits T CD4⁺ també són presents en la insulitis en pacients. La predominància de limfòcits T en la insulitis i de limfòcits T CD8⁺ respecte T CD4⁺ es va confirmar en els quatre casos mitjançant la caracterització histològica. No obstant, els transcrits propis de limfòcits T no constituïen una via tan destacablement alterada com s'esperava. Mitjançant *microarrays* no es va observar una sobreexpressió clara de marcadors leucocitaris o de citocines associades a una resposta de tipus Th1, Th2, Th17 o Treg. Això podria ser degut al fet que certes molècules poc abundants o produïdes per un nombre molt reduït de les cèl.lules d'un teixit –com les citocines– són difícils de detectar mitjançant *microarrays*, tal com s'ha descrit [286]. Sí es va detectar però la sobreexpressió d'un conjunt de gens (o *signature* transcripcional) induïbles per citocines proinflamàtores mitjançant anàlisis bioinformàtiques. En estudis posteriors hem analitzat l'expressió de citocines i marcadors propis de respostes de tipus Th1 i Th17 en els quatre casos i ambdues s'han detectat mitjançant una tècnica més sensible com és la qPCR a temps real.

Els limfòcits B s'han identificat en la insulitis dels casos d'inici, concordant amb d'altres treballs [112, 121, 130], i també en casos de cronificació. El paper dels limfòcits B en la DT1 no està del tot ben definit. S'ha demostrat que són necessaris pel desencadenament de la malaltia mitjançant el model murí NOD.Ig μ^{null} , deficient en limfòcits B i resistent a la DT1 [287], i a través de la depleció amb anti-CD20 monoclonal [288]. Se'ls ha atribuït com a funció més probable la presentació antigènica [160]. Cal destacar que tant en el ratolí NOD [289] com en d'altres malalties autoimmunitàries on els autoantígens persisteixen, es formen fol·licles ectòpics al teixit diana que faciliten la cooperació T-B [290]. En la DT1 humana la insulitis és escassa i no es formen aquest tipus d'estructures. No obstant, la sobreexpressió en pàncrees de BAFF (*TNFSF13*), factor de supervivència de cèl.lules B [291], probablement contribueix a la seva activació i funcionalitat. A més de cèl.lules B CD19⁺, vam detectar una sobreexpressió de transcrits d'immunoglobulines en pàncrees i en illots, indicant la presència de cèl.lules productores d'anticossos al teixit diana de la DT1 en tots els casos. Aquesta dada contrasta amb estudis en els que no es detecta una presència destacable de cèl.lules plasmàtiques en la insulitis humana mitjançant immunohistologia [121]. Els autoanticossos són un dels principals marcadors d'autoimmunitat en pacients amb DT1, però el seu paper patogènic en la malaltia està encara per demostrar. En el model NOD, la majoria de limfòcits B intrailot reconeixen

estructures neuronals [148]. En humans no es coneix l'especificitat dels anticossos intraïlot. En aquest treball descrivim per primera vegada la presència de trànscrips d'Igs en illots purificats d'un pacient amb DT1, a l'inici clínic. Un dels trànscrips d'Ig més augmentats en pàncrees i en illots correspon a la cadena pesada de les Igs d'isotip IgG3, isotip associat a l'activació del complement. Per tant, a banda de la seva especificitat, alguns dels autoanticossos podrien estar participant en la fagocitosis de debris cel.lulars a través de la unió a receptors Fc de la membrana de cèl.lules fagocítiques.

Els macròfags són una de les subpoblacions predominants en la insulitis en els casos estudiats pel nostre i per d'altres grups [121, 130]. La seva presència concorda amb la forta sobreexpressió de *CCL2* -factor atraient de monòcits i macròfags- detectada en pàncrees. En el model NOD s'ha demostrat l'efecte patogènic del reclutament de macròfags als illots mitjançant l'expressió transgènica de *CCL2* a les cèl.lules β [175]. En la DT1 humana, els macròfags presents en pàncrees podrien tenir també un paper patogènic contra les cèl.lules β , contribuint a la síntesi de citocines proinflamàtores, com s'ha observat per $\text{TNF}\alpha$ i $\text{IL-1}\beta$ [109], citocines amb potencial citolític sobre les cèl.lules β [292]. D'altra banda, els macròfags de pacients amb DT1 alliberen una major quantitat d'anió superòxid [293]. La producció d'espècies reactives d'oxigen per part de macròfags podria ser l'origen, almenys en part, de la sobreexpressió de gens d'estrès oxidatiu detectada en pàncrees i contribuir a la destrucció β . Una altra de les accions dels macròfags intrapancreàtics observats podria ser la producció dels factors del complement sobreexpressats [294].

El sistema del complement és una via de la immunitat innata alterada en diversos òrgans afectats per malalties autoimmunitàries [192]. Tot i que el fetge n'és l'òrgan productor principal, el complement també se sintetitza de forma extrahepàtica en monòcits, macròfags, cèl.lules endotelials i cèl.lules residents de diversos teixits [294]. En pàncrees de pacients amb DT1 vam detectar una sobreexpressió de la majoria de gens del sistema. L'activació del sistema del complement en pàncrees en la DT1 podria haver estat promoguda pels sensors de perill i activadors del sistema C1q i ficolina 1, sobreexpressats, i per la presència de dipòsits d'Igs [46, 295]. L'activitat del complement sembla estar regulada, com suggereix la sobreexpressió de diversos dels seus factors inhibidors en pàncrees. Una clara excepció és la disminució de l'expressió del factor regulador *CFHR1* en illots purificats, el dèficit del qual s'ha associat a dany tissular [296]. Aquest dèficit als illots podria actuar en sentit oposat, promovent un microambient permissiu per a l'activació del complement. La lisi de cèl.lules β mediada pel complement sembla poc probable donada la manca de sobreexpressió dels membres finals de la cascada, corresponents al complex d'atac a la membrana. Els factors del complement que actuen com a opsonines podrien participar en la fagocitosis de restes de cèl.lules β [295, 297] per part de macròfags. D'altra banda, l'activació local del complement podria contribuir a l'augment de la permeabilitat vascular dels illots i l'atracció de cèl.lules mieloides, mitjançant la interacció d'anafilatoxines amb els receptors sobreexpressats C3AR1 i C5AR.

Una de les hipòtesis de l'origen de l'autoimmunitat postula les infeccions víriques com a element desencadenant. En alguns casos reportats de pacients a l'inici de la DT1 es va aconseguir aïllar ocasionalment enterovirus en pàncrees [65, 298]. També en pàncrees de pacients amb DT1 s'ha descrit la presència d'IFNs de tipus I [47, 63] i de proteïnes d'enterovirus en illots de pacients amb DT1 [63, 134] i amb DT1 fulminant, en la qual sembla que una infecció vírica podria ser-ne l'element iniciador [67]. En la DT1, la presència d'IFNs i de Cocksackievirus es va associar en tres pacients a un tipus d'infiltrat no destructiu dominat per cèl.lules NK [63]. En el nostre estudi no es va detectar una sobreexpressió de gens d'IFNs a les mostres analitzades mitjançant *microarrays*. A més, només 2 transcrits propis de cèl.lules NK es van trobar sobreexpressats, NKG2D i DAP12, gens que poden expressar-se també en limfòcits T. Malgrat no detectar les pròpies citocines, sí es va observar una *signature* de resposta a IFNs en pàncrees total, de forma més marcada en el Cas 2. Aquest perfil afectava a gens induïbles tant per IFNs de tipus I com de tipus II. Dades de diversos grups indiquen que la presència d'una *signature* d'IFN és característica de pacients amb malalties autoimmunitàries [193, 194]. Entre aquestes destaca el SLE, on a més la *signature* d'IFN en PBMCs correlaciona amb la severitat dels símptomes clínics [193]. Un possible origen dels gens de induïts per IFN en pàncrees podria ser una infecció vírica. En el Cas 1 es va descartar la presència de seqüències virals de citomegalovirus (CMV), EBV i herpesvirus i estudis previs del grup ja havien descartat en els casos 1 i 4 la presència de seqüències d'enterovirus, adenovirus i retrovirus. Tot i així, seria interessant testar la presència de seqüències virals a la resta de casos. Alternativament, podria ser que part dels gens de resposta a IFN estessin induïts per IFN γ en el context d'una resposta Th1, i part estessin induïts per IFNs de tipus I produïts com a conseqüència de la senyalització dels receptors de la immunitat innata sobreexpressats [185].

Les alteracions transcripcionals i immunohistològiques observades reflexen la importància de la inflamació i la resposta innata en l'autoimmunitat contra la cèl.lula β [299]. La funció fisiològica de la inflamació és la reparació del dany tissular, però si no es resol pot acabar cronificant-se i causant encara més dany. En els pàncrees de pacients amb DT1 analitzats es va observar una forta inducció de gens que codifiquen per proteïnes de fase aguda. El factor prototípic de la resposta de fase aguda és la proteïna C reactiva o *CRP*, l'expressió de la qual es va trobar augmentada al teixit exocrí. La *CRP* normalment és produïda per hepatòcits en resposta a inflamació, però també s'ha observat en teixits extrahepàtics [300]. El seu lligand principal és la fosfocolina, un lípid alliberat en cèl.lules apoptòtiques [301]. L'expressió de *CRP* en àrees de teixit exocrí podria promoure la fagocitosi de restes pròximes de cèl.lules β apoptòtiques. Els gens de la família de factors proinflamatoris S100, expressats principalment per cèl.lules fagocítiques, també es van trobar sobreexpressats en pàncrees i en illots a l'inici clínic, concordant amb dades d'altres malalties autoimmunitàries [302]. La *CRP* en sèrum es troba augmentada en pacients amb DT1 [293] i les proteïnes S100 s'utilitzen com a biomarcadors d'inflamació [302]. En base a aquests exemples, creiem que seria interessant

tenir en compte els factors inflamatoris augmentats a l'òrgan diana com a possibles biomarcadors en sèrum en la DT1. Part dels factors de la immunitat innata sobreexpressats en pàncrees són considerats patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) o patrons moleculars associats a perill (DAMPs), aquests darrers alliberats en situacions de mort cel·lular. Alguns exemples de PAMPs i DAMPs sobreexpressats són els TLRs, C1q, el fibrinogen, la família S100A8/9/12, les proteïnes de xoc tèrmic de les famílies HSP40 i HSP70, a més de la fosfocolina (l·ligand de CRP). Aquests senyals de perill probablement expandeixen la resposta autoimmunitària, per exemple a través de l'activació dels macròfags [303] i del complement [295], i la inducció de citocines i quimiocines proinflamàtores [299]. HSP70 és un autoantigen en DT1 [304], té propietats immunomoduladores i podria ser un dels senyals de perill endògens que promoués la DT1, com s'ha observat en models experimentals d'aquesta malaltia [305]. D'altres gens l'expressió dels quals es troba fortament induïda participen en la immunitat antimicrobiana, com per exemple els gens de lisozima o *LYZ* (possiblement produïda per fagòcits), mucina i *REG3A*. Aquests es troben sobreexpressats en tots quatre casos, indicant la importància de la resposta innata al pàncrees també en fases cròniques de la DT1. La sobreexpressió de gens d'inflamació i immunitat innata es va detectar de forma més important en pàncrees total que en illots purificats, suggerint l'afectació inflamatòria del teixit exocrí, tal com es va comprovar en el cas de la CRP.

Certes quimiocines (proinflamàtores) són induïbles en situacions d'inflamació i, mitjançant un gradient de concentració, promouen la quimiotaxi leucocitària cap a la zona afectada per la inflamació/resposta immunitària [306]. En pàncrees total dels pacients analitzats vam detectar un perfil de sobreexpressió de quimiocines proinflamàtores i receptors. A part de la ja citada *CCL2*, els transcrits de *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL6* i *IL-8* van resultar augmentats, de forma mantinguda en fases de llarga evolució. Aquest grup de quimiocines és conegut com a ELR⁺ ja que presenten un motiu glutàmic-arginina-leucina (ELR) i estan implicades en l'atracció de leucòcits polimorfonuclears (PMN). Ocasionalment vam detectar la sobreexpressió de gens de neutròfils en pàncrees i en els quatre casos analitzats es van observar neutròfils en seccions tenyides amb H&E. Tot i així la seva presència va resultar escassa, possiblement degut a la seva curta vida mitjana. Els limfòcits T CD4⁺ de tipus Th17 tenen un paper patogènic en malalties inflamàtores i autoimmunitàries i s'han detectat als teixits diana d'aquestes [307]. Experiments realitzats recentment ens indiquen la presència de citocines pròpies de la resposta Th17 en els teixits pancreàtics dels casos analitzats. Un dels efectes de la IL-17 és la inducció de l'expressió del grup de quimiocines ELR⁺, constituïnt l' "eix Th17-ELR⁺" [308]. Aquest fenomen s'ha descrit en cèl·lules diana de malalties autoimmunitàries [309, 310]. En l'encefalomielitis autoimmunitària experimental o EAE, model experimental de MS, es va observar que a través d'aquesta via de quimiotaxi, els limfòcits Th17 induïen el reclutament de PMNs a la medulla espinal, reclutament necessari pel trencament de la barrera hematoencefàlica [309]. En la DT1 resta per determinar si els limfòcits T CD4⁺ Th17 contribueixen a la inducció local de quimiocines ELR⁺ i l'atracció de PMNs al pàncrees. Una altra

possibilitat seria que la presència de quimiocines ELR⁺, angiogèniques, estiguin implicades en un augment de la vascularització del pàncrees, com s'ha demostrat *in vitro* en el cas de la IL-8 produïda per cèl.lules ductals humanes [311].

L'activació de l'endoteli vascular és necessària perquè els leucòcits siguin reclutats i extravasats a un teixit inflammat. En cèl.lules endotelials dels illots, s'ha observat que l'expressió de MHC de classe I [312], molècules co-estimuladores [313] i molècules d'adhesió promouen la migració de limfòcits autoreactius. En pacients amb DT1 s'havia descrit prèviament l'expressió d'HLA de classe I i II, ICAM1, VLA, VCAM i LFA3 en cèl.lules endotelials [46, 130]. En nostre estudi vam observar alteracions en l'expressió gènica d'*ICAM1* i la *VCAM1* (molècula d'adhesió vascular 1), concordant amb resultats publicats [130]. A més, vam descriure per primera vegada la sobreexpressió del receptor de tipus *scavenger* CD36 a l'endoteli dels illots i del pàncrees. El seu augment podria promoure la inflamació a través de la seva funció com a receptor de productes d'oxidació lipídica, presents en condicions d'inflamació i en cèl.lules apoptòtiques [314]. La sobreexpressió de CD36 i *VCAM1* en tots els casos ens suggereix que possiblement al pàncrees segueix havent-hi un endoteli activat en fases de llarga durada de la malaltia.

Una hipòtesi recent suggereix que l'autoimmunitat en la DT1 podria ser, igual que en d'altres malalties autoimmunitàries com MS o SLE, un procés amb fases de recaiguda i de remissió [315]. Les fases de recaiguda serien fases més actives de destrucció autoimmunitària de cèl.lules β , mentre que en les de remissió prevaldria una resposta immunoreguladora. En pàncrees de pacients, es va identificar la sobreexpressió de molècules immunoreguladores com *VSIG4* i *VTCN1*, trànscrips de molècules co-estimuladores de la família B7 amb funció inhibidora. Aquest fet suggereix la presència d'APCs amb funció reguladora en la insulitis. *VSIG4* és alhora un receptor del complement i participa en l'eliminació de patògens, per tant podria participar també en l'eliminació de cèl.lules β apoptòtiques [316]. Els nostres resultats indiquen per tant la presència d'elements de limitació de la resposta en la insulitis destructiva. La inducció d'aquestes vies d'immunoregulació detectades podria contribuir a la generació d'APCs tolerogèniques amb aplicacions terapèutiques [317]. Però en aquest intent de fre de la resposta no només hi intervindrien les pròpies cèl.lules del sistema immunitari. Les nostres dades junt amb les d'altres autors [318] ens permeten interpretar que en la situació de dany en la que es troba, el propi illot pancreàtic té capacitat per posar en marxa mecanismes de regulació com a intent d'autoprotecció. Alguns exemples serien l'expressió de xaperones, HLA no clàssic, metal·lotioneïnes, certes quimiocines, etc. Un grup de factor immunoreguladors sobreexpressats són els HLA no clàssics *HLA-E*, *HLA-F* i *HLA-G*. L'expressió d'*HLA-E* detectada en alguns illots i al teixit exocrí proper podria estar relacionada amb l'augment de MHC I, ja que *HLA-E* monitoritza l'expressió de MHC de classe I existent un lloc determinat a través de la presentació dels seus pèptids senyal derivats [319]. Les molècules d'*HLA-G* s'expressen en òrgans immunoprivilegiats i en cèl.lules epitelials tímiques, però també en cèl.lules α , β i ductals del pàncrees de forma

constitutiva [318, 320]. L'HLA-G inhibeix funcions efectores de cèl.lules NK i limfòcits TCD8⁺ i indueix respostes immunoreguladores a través de Tregs i APCs [320]. En pàncrees dels pacients diabètics analitzats es va observar un augment d'expressió de certes parelles de molècules capaces d'interactuar i exercir una funció immunoreguladora. LILRB1 és un receptor leucocitari d'HLA de classe I inhibidor, amb afinitat preferencial per HLA-G [321]. En el nostre estudi se'n va detectar un augment d'expressió en pàncrees en tots quatre casos analitzats (en cèl.lules CD45⁺, resultats no mostrats). La interacció entre les molècules d'HLA de classe I dels illots (clàssic i no clàssic) i el receptor LILRB1 dels leucòcits infiltrants podria ser un dels mecanismes d'intent d'inhibició de la destrucció mediada per CTLs, ja que LILRB1 competeix amb CD8 per la unió a MHC de classe I [321]. Un mecanisme descrit recentment en el model NOD és l'efecte protector de l'eix CXCL12-CXCR4, sobreexpressat en pàncrees en els casos analitzats. Els limfòcits T CXCR4⁺ inhibeixen la capacitat diabetogènica dels limfòcits T de ratolins NOD diabètics al ser co-transferits a ratolins immunodeficients, aparentment a través d'una resposta Th2 [322]. Curiosament també s'ha observat l'efecte quimiorepel.lent de CXCL12 sobre limfòcits T diabetogènics, disminuint l'activació de les integrines i l'adhesió a l'endoteli microvascular dels illots [323]. En aquest sentit, no es pot descartar que la sobreexpressió insular de *CXCL12* i del seu receptor *CXCR7* observada en pacients generin un efecte protector o quimiorepel.lent de fre de l'extravasació de limfòcits autoreactius.

Un aspecte important que es desprèn del nostre estudi és la magnitud de les alteracions immunològiques en fases cròniques de la malaltia, quan pràcticament tota la població β ha estat destruïda. Els estudis reportats anteriorment en pàncrees de pacients diabètics han centrat l'interès en l'inici recent de la malaltia [63, 109, 121, 129, 130], probablement ja que en aquesta fase la insulitis és més activa [46]. Tot i així, en el nostre estudi vam detectar la presència de leucòcits als illots i en àrees properes de teixit exocrí en els casos de llarga evolució. A més, vam observar que part de la resposta inflamatòria/immunitària segueix activa en l'estadi de cronicitat de la malaltia, en contra de la hipòtesi considerada durant molts anys, que descrivia la insulitis com un procés agut, coincidint amb l'inici clínic. Trànscrips de marcadors leucocitaris, immunoglobulines, molècules antibacterianes, quimiocines atraients de neutròfils i monòcits i factors immunoreguladors es van observar sobreexpressats en pàncrees de pacients tant d'inici com de llarga evolució. Aquests factors probablement contribueixin a la perpetuació de la resposta autoimmunitària en fases de llarga evolució. En aquestes fases es detecta C-pèptid residual, indicatiu de producció d'insulina endògena, en un terç dels pacients amb DT1 [324]. Però la resposta autoimmunitària segueix sent-hi present, podent neutralitzar un possible intent de regeneració de les cèl.lules β .

A banda de les variacions transcripcionals de gens del sistema immunitari també es van detectar importants alteracions en l'expressió de gens propis del teixit pancreàtic. Tal com s'esperava es va detectar una important reducció de trànscrips que reflecteix la destrucció de cèl.lules β . Curiosament però, també es van detectar alteracions transcripcionals d'altres

hormones insulars. És remarcable la discordància l'expressió del gen del polipèptid pancreàtic, disminuïda en els casos 1 i 4 però sent el gen més sobreexpressat en pàncrees dels casos 2 i 3. Una possible explicació té a veure amb la distribució de les cèl.lules PP al pàncrees, que predominen als illots situats al cap de l'òrgan [325]. Els blocs de teixit del Cas 3 corresponien a aquesta regió, mentre que els blocs de pàncrees dels casos 1 i 4 corresponien a la regió de la cua del pàncrees. Les cèl.lules α i δ , en canvi, presenten una distribució homogènia als illots de les diferents regions del pàncrees. Les variacions en l'expressió de glucagó i somatostatina observades podrien ser un procés homeostàtic per reestructurar els illots després de la destrucció de la massa cel.lular β . Un altre component dels illots que sembla afectat és el sistema nerviós. Aquest és un fet interessant, ja que en el model NOD s'ha demostrat la destrucció de l'envolta neuronal dels illots al llarg de la diabetogènesi [96]. En pacients amb DT1 fins al moment no s'ha pogut constatar la destrucció del sistema nerviós insular, però sí n'existeixen indicis d'afectació. S'han detectat respostes humoral i cel.lular contra antigens del sistema nerviós com GFAP i S100 β en pacients i familiars ICA⁺ [96]. Per tant, seria interessant confirmar si existeix afectació neuronal dels illots en pacients amb DT1 mitjançant d'altres tècniques i establir una possible relació amb la presència d'autoanticossos i/o limfòcits T específics d'antigens neuronals. De confirmar-se, aquest fet podria ser important ja que la innervació del sistema nerviós insular regula la funció de tots els tipus cel.lulars endocrins. L'aprofundiment en aquest tema tindria també interès des del punt de vista de la neuropatia diabètica, una de les complicacions principals de la DT1.

La funció dels acins exocrins, encarregats de la secreció d'enzims digestius, ha estat poc estudiada en el context de la DT1. El teixit exocrí sembla estar afectat en els casos corresponents a l'inici de la malaltia, sobretot en el Cas 1 (inici clínic). Així ho indica la disminució de l'expressió de gens d'enzims digestius propis d'aquest teixit, juntament amb la presència de factors inflamatoris/immunològics (CD44, CRP, HLA-E, REG3A), l'aspecte lleugerament desestructurat del teixit exocrí observat en seccions tenyides amb H&E i l'aspecte macroscòpic del pàncrees. En la fase inicial de la DT1 s'ha descrit una lleu disfunció exocrina, sense conseqüències clíniques importants [326]. S'ha suggerit també que l'afectació del teixit exocrí podria tenir un component autoimmunitari [327]. Aquesta resposta probablement sigui un efecte colateral del dany contra les cèl.lules β . Tot i així, no es pot descartar que en alguns casos fós un desencadenant de l'autoimmunitat contra els illots, promovent la inflamació i el reclutament de limfòcits autoreactius específics contra les cèl.lules β . Les afectacions digestives a l'inici de la DT1 s'han relacionat sobretot amb alteracions en el sistema immunitari i la permeabilitat de la mucosa intestinal [77]. Segons les nostres dades, també podrien estar relacionades amb una alteració transitòria de la secreció d'enzims pancreàtics deguda a la inflamació concomitant. En els casos de llarga evolució 3 i 4, mitjançant *microarrays* no es va detectar un perfil alterat de trànscrips d'enzims exocrins però mitjançant qPCR es va observar que el nivell d'expressió gènica de la proteïna relacionada amb la lipasa pancreàtica (*PNLIP*) no

assolia el nivell dels controls. Seria interessant confirmar que la funció exocrina es recupera totalment analitzant mostres de pacients de llarga evolució en futurs estudis.

Paral·lelament a la destrucció β , en els pàncrees dels pacients analitzats vam detectar alteracions que suggereixen processos de remodelació tissular. Per exemple, es va detectar un augment en gens relacionats amb fibrosi, com el colàgen i proteoglicans de la matriu extracel·lular. L'augment de trànscrips de colàgen podria estar induït per *TGF β 2*, sobreexpressat, com s'ha suggerit en un model de pancreatitis [328]. A més de processos de reparació, es va observar un augment de factors associats a regeneració insular. Les cèl·lules β tenen una baixa capacitat de regeneració, però s'han detectat en pàncrees de pacients fins 67 anys després de l'inici clínic de la DT1 [206]. En humans, la regeneració de cèl·lules β es pot donar mitjançant replicació β o bé neogènesi d'illots a partir de progenitors ductals. En el Cas 1 s'havien observat fenòmens de neoformació d'illots a partir de l'epiteli ductal en un estudi anterior [46]. En el nostre estudi vam observar la presència ocasional de cèl·lules β fins 10 anys després de l'inici clínic i mRNA d'insulina en tots els casos (indicatiu d'un remanent de cèl·lules β). En el Cas 3 en particular, s'observa amb freqüència agrupacions de petits illots semblants a illots en formació. En els darrers anys s'han generat expectatives en el camp de la regeneració de cèl·lules β , en part gràcies a la identificació d'agents que actuen com a factors de proliferació/creixement de les cèl·lules productores d'insulina [329]. En models experimentals, la pancreatectomia parcial promou una hiperplàsia insular i l'activació de gens de regeneració de la família REG [330]. La família REG és un grup de lectines de tipus C que actuen com a factors de regeneració de cèl·lules β [221]. El pàncrees és un dels teixits on més s'expressen i són induïbles en condicions de regeneració d'illots i d'inflamació [221]. A més, REG3A i REG3G són factors de la immunitat innata amb efectes antimicrobians [235]. En els quatre casos estudiats es va detectar un augment de gens de la família REG, tant en pàncrees total (REG3A, REG3G, REG4) com en illots (REG4). Paradoxalment, l'augment d'aquests factors, a més de promoure la regeneració dels illots, podria tenir un efecte diabetogènic, ja que també s'han proposat com a autoantígens en DT1 [229, 234]. Per tant, l'augment de producció de REG podria estar promovent la regeneració insular, però alhora la inflamació i la resposta autoimmunitària contra els illots.

Per tenir una visió de conjunt de les alteracions immunològiques en la DT1, és interessant contrastar el transcriptoma del teixit diana amb els perfils d'expressió en perifèria, en els quals les mostres de pacients són molt més accessibles. Fins al moment s'han publicat dos treballs que determinen el perfil d'expressió gènica en PBMCs de pacients amb DT1, tots dos corresponents a l'estadi de diagnòstic recent. En els perfils descrits destaca una alteració de gens relacionats amb l'apoptosi i la proliferació cel·lular, molts d'ells regulats per IL-1 β [196, 197]. D'entre els 282 gens del sistema immunitari alterats en els casos d'inici de la malaltia del nostre estudi, només 10 coincideixen amb gens alterats en PBMCs en aquest mateix estadi [197]. En un estudi amb una aproximació diferent es van determinar els canvis d'expressió en

PBMCs induïts per factors proinflamatoris del sèrum de pacients amb DT1. En aquest cas, els autors van identificar un conjunt de gens mitjançant els quals es podia discriminar entre pacients o individus amb autoanticossos i controls sans. Aquest conjunt estava constituït principalment per gens del sistema immunitari, la majoria d'ells regulats també per IL-1 β . En pacients de llarga evolució, la no detecció d'aquest perfil associat a IL-1 β es va atribuir a la desaparició de la resposta autoimmunitària en aquesta fase [198]. Aquestes dades contrasten amb els perfils descrits al teixit diana en el nostre estudi, on sí es van detectar evidències de resposta autoimmunitària activa en pacients de 8 i 10 anys d'evolució. Per identificar biomarcadors alterats en perifèria en fases de llarga evolució, on la resposta autoimmunitària és menor, suggerim guiar-se pels factors sobreexpressats en aquest estadi al teixit diana per a l'elecció dels candidats a biomarcadors. En conjunt però, els perfils d'expressió gènica en perifèria mostren notables diferències respecte les alteracions observades en pàncrees. A més, dades recents de models experimentals remarquen les diferències de la resposta autoimmunitària en illots i en perifèria. S'ha demostrat que clonotips de limfòcits T CD4⁺ diabetogènics presenten característiques diferents –en quant a fenotip, capacitat diabetogènica i repertori del TCR– segons si provéne de perifèria o són infiltrants d'illots, essent en aquest darrer cas més diabetogènics [331]. Per una banda, per tant, les anàlisis realitzades en sang perifèrica/sèrum tenen una clara aplicabilitat pronòstica, diagnòstica i de seguiment. Però per una altra les alteracions del sistema immunitari en perifèria no són un fidel reflex de la resposta als illots. Això fa palesa la importància i la necessitat dels estudis del teixit diana en les malalties autoimmunitàries.

Com a alternativa a la dificultat d'obtenció de mostres, les alteracions d'expressió gènica dels illots i del pàncrees s'han estudiat en models murins experimentals de DT1. En el model NOD es va reportar l'anàlisi de l'expressió d'un conjunt de gens d'inflamació als illots en diversos estadis de progressió, indicant un pic d'expressió d'integrines, factors angiogènics i citocines proinflamatòries a l'inici de la insulitis i de molècules d'adhesió i quimiocines en fases de progressió més avançades [332]. En la soca NOD el perfil del transcriptoma complet s'ha analitzat en models congènics amb insulitis destructiva (pàncrees total) [205] i mitjançant la inducció amb CY (illots) [142]. Aquests treballs mostren alguns punts en comú amb les alteracions detectades al pàncrees i als illots en pacients amb DT1 i en el model experimental NOD RIP-IFN β , com l'augment d'expressió de quimiocines proinflamatòries i de gens de la família Reg. D'altres punts en comú amb el pàncrees en la insulitis destructiva murina són la inducció de gens de la via de la IL-6, molècules de presentació antigènica i metal·lotioneïnes. En la DT1 murina es detecta una preponderància de gens de resposta a IFN. Aquest perfil de gens induïbles per IFN és més marcat en la insulitis murina experimental que en les mostres dels quatre casos analitzats. Algunes diferències entre els perfils en la DT1 experimental i els pàncrees de pacients caracteritzats són l'augment de trànscrips de citocines sí detectades mitjançant *microarrays* en la insulitis murina, molt més prominent. En el model de DT1 induïda

mitjançant CY es detecta una disminució de trànscripats d'Igs als illots, però com es comenta al propi article, cal tenir en compte que en aquest cas la insulinitis destructiva es va induir mitjançant un fàrmac que causa efectes tòxics en les cèl·lules B. En la DT1 humana, en canvi, s'ha observat un augment d'Igs. D'altres processos més remarcables en la DT1 humana són la resposta inflamatòria, el sistema del complement i la immunoregulació. Una possible explicació d'aquestes discrepàncies podrien ser les característiques de la insulinitis, diferents en la DT1 humana i l'experimental. El ratolí NOD presenta una major infiltració leucocitària que els pacients de DT1, en la qual la subpoblació predominant són els limfòcits T CD4⁺. La insulinitis humana, en canvi, és força més escassa i hi predominen els limfòcits T CD8⁺. A més, els estudis citats són models murins induïts o genèticament modificats, en els quals la diabetogènesi es dona de forma molt més aguda i agressiva que en pacients, en els quals el procés pot durar anys.

Alguns mecanismes de la resposta autoimmunitària podrien ser comuns en diferents malalties, segons els perfils d'expressió gènica del teixit diana. Existeixen estudis descriptius del transcriptoma d'òrgans afectats en pacients amb miositis [202], SLE i nefritis [201], SSj [333], RA [334], malalties autoimmunitàries de la tiroide [335], psoriasi artrítica (PsA) [336] i MS [203]. En conjunt, els resultats indiquen una sobreexpressió de trànscripats del sistema immunitari a l'òrgan afectat [192]. En l'autoimmunitat es produeix una desregulació de la resposta immunitària, amb afectacions tissulars diverses pròpies de cada malaltia. El tipus de resposta efectora varia entre patologies. Possiblement ve condicionada per la predisposició genètica i ambiental, les errades en la tolerància central i perifèrica inherents a cada patologia/individu, el mecanisme iniciador, la persistència o desaparició dels autoantígens al llarg de la progressió i les característiques pròpies del teixit afectat (capacitat de regeneració, sensibilitat/resistència a l'apoptosi, citocines, estrès oxidatiu, complement, etc). Tot i així, els perfils d'expressió gènica dels òrgans diana mostren l'alteració de vies comunes, com per exemple la sobreexpressió de gens d'HLA [202, 203, 333, 334], de resposta a IFN [201, 202, 333, 334], immunoglobulines i gens de limfòcits B [201-203, 333-336], molècules d'adhesió [203, 335, 336], trànscripats del sistema del complement [202, 203, 334], de quimiocines [333, 335, 336], gens de vies de senyalització de citocines proinflamàtòries com IL-1, IL-6, IL-17 [203, 336], trànscripats de limfòcits T [333-336] i de cèl·lules mieloides [201, 336]. El perfil de gens del sistema immunitari sobreexpressats als pàncrees/illots de pacients amb DT1 estudiats concorden de forma general amb el d'altres òrgans afectats per autoimmunitat. Els trànscripats que mostren expressió disminuïda solen estar relacionats, com en el cas de la DT1, amb la funció pròpia dels teixits afectats: funció muscular en les miopaties [202], canals iònics al glomèrul en SLE [201], etc., i sistemes endocrí i nerviós en els casos analitzats en el nostre estudi. Les alteracions comunes de vies funcionals observades en diferents malalties autoimmunitàries (entre elles, la DT1) podrien ser desencadenants necessaris a l'òrgan diana per trencar definitivament la tolerància i responsables de mantenir l'autoimmunitat de forma sostinguda entre tres tipus de factors: factors inflamatoris i de la immunitat innata produïts pel

propi teixit; limfòcits autoreactius / autoanticossos establint la resposta efectora i amplificant la inflamació; mecanismes per contrarestar la resposta autoimmunitària (eliminació de cèl.lules apoptòtiques, cèl.lules mieloides amb capacitat tolerogènica, factors immunoreguladors i d'intent de regeneració del teixit afectat).

En base a les alteracions transcripcionals i immunohistològiques observades a l'òrgan diana de la DT1, a la **Figura 38** es proposa un esquema hipotètic dels processos participarien en la destrucció autoimmunitària de les cèl.lules β .

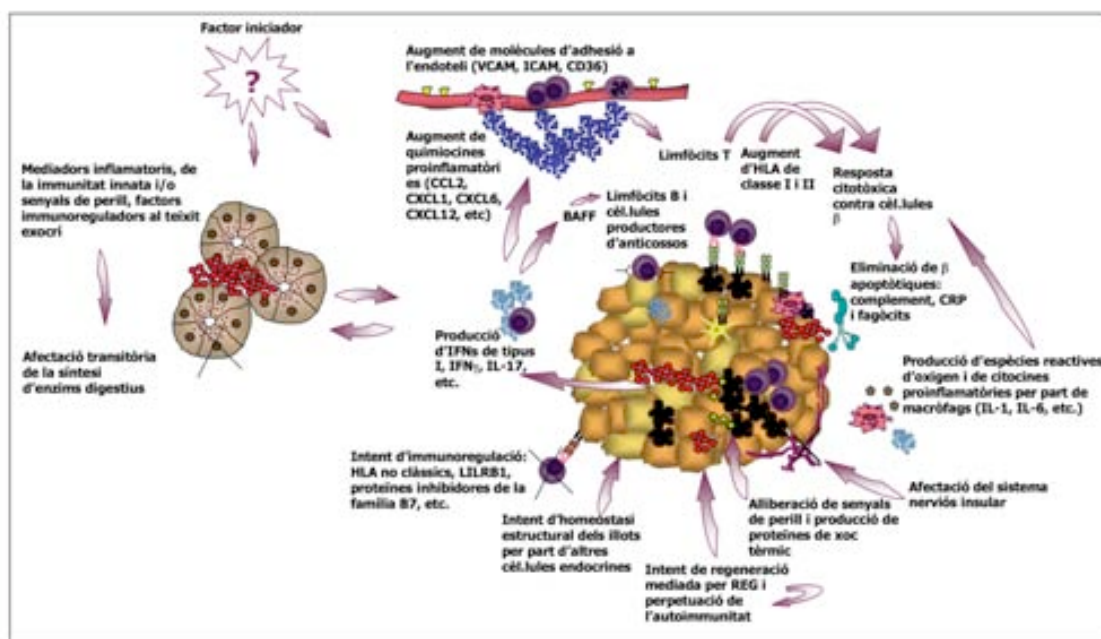


Figura 38. Processos de la resposta autoimmunitària que afecten el pàncrees de pacients amb DT1.

Aquests processos, alguns d'ells escassament estudiats en el context de la DT1, podrien ser claus per explicar el desencadenament i la cronificació de la malaltia. En alguns individus amb predisposició genètica, l'autoimmunitat contra les cèl.lules β evoluciona generant símptomes clínics i cronificant-se. Però existeixen individus sans que presenten també manifestacions autoimmunitàries (presència d'autoanticossos en sèrum). Un factor desencadenant que cursi amb menor inflamació en pàncrees, o bé un millor control de la resposta en fases preclíniques (immunoregulació, eliminació ràpida de les primeres cèl.lules β apoptòtiques) podrien aconseguir extingir una resposta autoimmunitària incipient en alguns individus prediabètics. En d'altres casos, un factor desencadenant ambiental (virus, estrès, etc.) més potent podria generar una resposta específica més aguda o agressiva, destruint la major part de massa cel.lular β i causant símptomes d'hiperglicèmia. Aquest procés estaria sustentat per un important component inflamatori i de la immunitat innata, en part des del teixit exocrí, que fins i tot en podria ser-ne el desencadenant.

Alguns autors han posat de manifest l'heterogeneïtat de la resposta autoimmunitària en pàncrees de pacients amb DT1 [337]. Els perfils d'expressió gènica dels quatre casos presentats

en aquest treball també mostren bastantes diferències interindividuais. De fet, podria ser que hi hagués més d'un "subtipus" de diabetis autoimmunitària segons el seu origen. Un tipus diferent de factor iniciador explicaria diferències interindividuais com per exemple la *signature* d'IFN. A més, polimorfismes en gens d'inflamació, immunitat innata i adaptativa, complement, eliminació de cèl.lules apoptòtiques i immunoregulació podrien traduir-se en diferències d'expressió gènica, i influir en la capacitat individual per promoure/controlar la resposta autoimmunitària. Les diferències interindividuais d'expressió gènica són especialment remarcables entre els dos casos de llarga evolució, de 8 i 10 anys respectivament. La teoria de la DT1 com a malaltia amb processos de recaiguda i remissió podria ser clau per explicar les diferències en quant a alteracions dels sistemes immunitari i endocrí en fase crònica. En les fases de remissió o immunoregulació podria ser determinant la capacitat de cada individu de posar en marxa mecanismes de regeneració (neogènesi o replicació a través de gens REG, MMc, etc.) que multipliquessin les cèl.lules β remanents. En models murins s'ha demostrat que en condicions lliures d'autoimmunitat, la població β destruïda és recuperable mitjançant proliferació [211]. Però en humans la capacitat de replicació β és molt baixa. A més, en fases de llarga evolució segueix havent-hi sobreexpressió d'HLA, factors quimiotàctics i de la immunitat innata i molècules d'adhesió en pàncrees. És lògic per tant que se segueixin extravasant limfòcits T memòria autoreactius als illots i la destrucció β continuï. D'aquesta manera s'acabaria prolongant el cicle de destrucció autoimmunitària-immunoregulació-intent de regeneració al llarg del temps.

2. EL MMc PODRIA INFLUÏR EN ELS PROCESSOS DE DESTRUCCIÓ I REGENERACIÓ DE LES CÈL.LULES β

El microquimerisme és un fenomen fisiològic que es produeix durant l'embaràs mitjançant la transferència cel.lular entre mare i fetus. Les cèl.lules que conformen el Mc són semiallogèniques i sovint es troben amb major freqüència en teixits d'individus afectats per l'autoimmunitat. Aquests fets n'han suggerit un possible paper en aquest tipus de malalties. El tipus més freqüent i estudiat de Mc és el d'origen fetal. El FMc s'ha associat per exemple a malalties autoimmunitàries endocrines (AITD), on se n'ha observat un augment en teixit glandular afectat [271, 338]. Però existeix certa controvèrsia sobre el seu efecte: mentre alguns autors defensen la idea que el FMc tindria un efecte de tipus "empelt contra hoste", d'altres li atribueixen funcions de reparació donat el fenotip epitelial de les cèl.lules fetals en la part danyada del teixit. A diferència del FMc, el MMc s'origina en una fase del desenvolupament on el sistema immunitari de l'hoste és relativament immadur. Aquest fet podria afavorir la tolerització i implantació tissular del MMc i fer possible que hi hagués cèl.lules maternes amb funció més fisiològica que patològica.

En un intent d'ampliar l'estudi de les alteracions en pàncrees de pacients amb DT1, es va analitzar la presència del MMc en els quatre casos caracteritzats mitjançant transcriptòmica.

En aquest treball vam observar cèl.lules β maternes en illots humans i vam detectar una tendència a l'augment de la freqüència de MMc en pàncrees de pacients amb DT1. La petita sèrie de pàncrees analitzats forma part d'un estudi actual més ampli en col.laboració amb el grup de la Dra. K. M. Gillespie (Universitat de Bristol), amb un major nombre de mostres analitzades. L'anàlisi del microquimerisme matern mitjançant FISH amb sondes específiques pels cromosomes X i Y presenta algunes limitacions a les quals es va intentar fer front. L'aproximació utilitzada permet discriminar les cèl.lules pròpies (XY) de les maternes (XX) en mostres pertanyents a homes. Una alternativa per poder quantificar el MMc en teixits d'individus d'ambdós sexes seria l'anàlisi de l'al.lel matern no heretat d'HLA (*non-inherited maternal antigen*, NIMA), amplificable mitjançant qPCR [261]. Per tal d'augmentar el nombre de mostres de l'estudi, es va intentar amplificar el NIMA a partir de DNA de teixit pancreàtic del Cas 1 [46] i de 2 controls addicionals, tots ells dones. Malauradament, l'intent de d'amplificació del NIMA amb un panell d'oligonucleòtids específics per diferents al.lels d'HLA-DR no va donar resultats positius. Les cèl.lules maternes no són l'única font possible de quimerisme. Per tant, es va voler descartar la presència de quimerisme provinent d'altres fonts, com les transfusions sanguínies i els transplantaments. En el Cas 3 es va tenir accés a la història clínica del pacient i es va comprovar que no hi constaven cap d'aquests 2 processos. En l'anàlisi realitzada mitjançant FISH existeix la possibilitat que alguna cèl.lula amb dos cromosomes X es trobés en fase de mitosi (XXXX, XYXY) o fós poliploide com a producte d'una fusió (XXXXY, XYXY) o una no-disjunció (XXY). Però es van observar cèl.lules XX en seccions híbrides amb sondes de FISH en diferents plans consecutius mitjançant microscopia confocal i en cap d'aquestes es va detectar un cromosoma Y.

Les cèl.lules maternes es poden trobar com a cèl.lules diferenciades formant part de diversos òrgans, alguns dels quals són diana de l'autoimmunitat. Per exemple, s'ha demostrat que hi ha cèl.lules maternes amb fenotip de cèl.lules β pancreàtiques [264], miòcits [256], queratinòcits [263], cèl.lules epitelials [262], etc. Els resultats del nostre estudi confirmen la contribució del microquimerisme matern a la població cel.lular β en illots d'individus sans. Molt probablement les cèl.lules maternes s'implanten al teixit fetal com a cèl.lules progenitores i es diferencien posteriorment a cèl.lules β als illots de l'hoste.

El sistema immunitari de l'hoste és capaç de tolerar les cèl.lules maternes, malgrat que aquestes expressin un 50% d'HLA matern no heretat. Recentment s'ha descrit un mecanisme tolerogènic de les cèl.lules maternes en humans: la generació durant l'etapa fetal de cèl.lules T reguladores ($TCD4^+ CD25^{\text{high}} FoxP3^+$) als nòduls limfàtics, que suprimeixen la resposta de limfòcits T contra antígens maternos [339, 340]. Aquest mecanisme persisteix a llarg termini i podria explicar la tolerància de les cèl.lules maternes pel sistema immunitari de l'hoste. En ratolí s'ha demostrat que l'exposició oral a antígens maternos durant l'alletament i el nivell de MMc durant l'edat adulta promouen la resposta tolerogènica contra els antígens maternos [341]. L'existència de mecanismes tolerogènics dels antígens maternos suggereix un possible efecte

beneficis de les cèl.lules maternes per l'hoste. Aquest efecte podria ser, tal com s'ha suggerit, l'intent de reparació de teixits danyats.

Les cèl.lules d'origen matern al pàncrees semblen estar enriquides en la població β , diana de l'autoimmunitat en la DT1. Segons els nostres resultats, la freqüència de cèl.lules β maternes és superior a la freqüència del total de cèl.lules (β i no β). A més, en pacients diabètics es va observar una tendència a l'augment de MMc en pàncrees, corroborant així observacions prèvies [264, 342]. Resultats recents en col.laboració amb el grup de la Dra. K. M. Gillespie ampliant el nombre de mostres (cinc casos de DT1, quatre controls) indiquen un augment significatiu de MMc en pàncrees en pacients ($p=0,0305$). Les cèl.lules β maternes són semiallogèniques, i per tant poden presentar part dels seus pèptids endògens a través de l'HLA matern. L'HLA matern pot estar associat a un grau de susceptibilitat a la DT1 major, menor o equivalent al de l'hoste, influint així en la susceptibilitat/resistència a l'autoimmunitat. En pacients diabètics amb un haplotip HLA de susceptibilitat, la presència de cèl.lules β amb un HLA matern menys predisposant podria ser l'explicació de la persistència d'aquestes cèl.lules als illots. Una altra possibilitat seria que la major freqüència de cèl.lules β maternes en pàncrees DT1 sigui deguda que aquestes presentin algun mecanisme immunoregulator que les faci més resistents a l'atac autoimmunitari, com per exemple l'expressió de molècules d'HLA no clàssic. Se sap per exemple que l'HLA-G s'expressa en cèl.lules endocrines dels illots pancreàtics humans [318]. A més, als propis teixits pancreàtics de pacients amb DT1 analitzats s'hi va detectar un augment de l'expressió d'HLA-E, F i G. Seria interessant analitzar l'expressió d'HLA no clàssics específicament a les cèl.lules β maternes com factors potencials de defensa d'aquestes contra l'autoimmunitat.

Les cèl.lules β maternes o els seus precursors, en cas de resistir la destrucció autoimmunitària, podrien tenir certa capacitat replicativa i contribuir a la regeneració del teixit danyat. La observació ocasional de grups de 2-3 cèl.lules maternes situades de forma adjacent, en suggereix la replicació prèvia. Experiments recents del grup en col.laboració han mostrat la presència de fins 6 cèl.lules maternes en un mateix camp visual. En l'únic treball reportat sobre DT1 i microquimerisme matern en pàncrees [264] es van fer un recompte de cèl.lules poliploides que poguessin provenir d'una replicació (XXXX, XYXY) o d'una fusió (XXXY): hi havia més cèl.lules que podrien haver derivat d'una replicació, i en major nombre en els pàncrees de pacient diabètics que en els control. Si les cèl.lules maternes tenen més capacitat de replicació que les pròpies de hoste és una característica que encara està per determinar. En el futur, es pretén optimitzar la tinció immunohistològica de Ki67 de forma concomitant amb FISH en els pàncrees diabètics per analitzar la replicació cel.lular de les cèl.lules maternes. Una altra possibilitat és que en individus adults existeixi un pool de cèl.lules maternes menys diferenciades que siguin reclutades als illots a conseqüència d'algun factor quimioattractant present en la insulinitis, com podria ser CXCL12. Aquesta quimiocina es troba sobreexpressada als illots dels pacients amb DT1 analitzats (casos 1 i 4) i és capaç d'atraure cèl.lules progenitores

cap a teixits en regeneració [343]. A més, en pàncrees murí s'ha demostrat que CXCL12 s'expressa en cèl.lules endocrines i augmenta la migració i la capacitat replicativa de cèl.lules progenitores ductals en un model amb hiperplàsia insular [344]. Les cèl.lules β són una població cel.lular amb baixa capacitat regenerativa, però s'han detectat indicis de regeneració β en pacients diabètics fins després de sis dècades de l'inici clínic de la malaltia [206]. Podria ser que alguns marcadors de diferenciació i de regeneració, com per exemple factors de la família REG, es trobéssin diferencialment expressats en les cèl.lules β maternes.

Algunes cèl.lules d'origen matern són hematopoètiques. De fet, en pacients amb DT1 es va detectar un augment de MMc respecte controls en sang perifèrica [264]. Les cèl.lules hematopoètiques d'origen matern podrien tenir un efecte patogènic en la destrucció β . No obstant, l'absència de cèl.lules maternes CD45⁺ en pàncrees reportada sembla descartar aquesta possibilitat [264]. La contribució de les cèl.lules maternes a la població β ($\approx 1\%$) en individus sans observada en aquest i en d'altres estudis [264] en suggereix una possible funció fisiològica. La major proporció de MMc detectada en pàncrees diabètics aniria en contra de la idea de les cèl.lules maternes com a diana l'autoimmunitat. Les cèl.lules pancreàtiques maternes podrien haver estat inicialment reclutades com a cèl.lules troncal amb potencial regeneratiu, persistint i diferenciant-se al llarg del temps i col.laborant en processos de reparació tissular. Dins d'aquestes, les cèl.lules β maternes, semiallogèniques, podrien ser més resistents a la resposta dels limfòcits T autoreactius contra antígens insulars presentats en el context d'un HLA de susceptibilitat a la DT1. D'aquesta manera podrien persistir i contribuir a l'intent de regeneració de les cèl.lules productores d'insulina. El grau de MMc en pàncrees en un hoste amb DT1 seria un factor "ambiental" protector, que predisposaria a l'intent de regeneració de les cèl.lules β maternes durant la destrucció autoimmunitària. Són necessaris nous estudis sobre el fenotip, el transcriptoma i la funcionalitat de les cèl.lules maternes, que podrien ser condicionants per contrarestar l'evolució de l'autoimmunitat contra les cèl.lules β .

3. LES CITOCINES, QUIMIOCINES I GENS Reg CONTRIBUEIXEN A L'ACCELERACIÓ DE LA DT1 EXPERIMENTAL MEDIADA PER IFN β

En la DT1 humana hem constatat la importància dels factors inflamatoris i de la immunitat innata a l'òrgan diana. L'expressió d'IFN β -factor proinflamatori i antiviral- a les cèl.lules β promou una DT1 d'aparició prematura a les tres setmanes d'edat, tant en models experimentals de susceptibilitat (NOD) com de resistència (NOR) a la malaltia [181]. L'aparició de DT1 en edats prematures podria ser en certa manera comparable amb alguns casos clínics de DT1 en nens menors de cinc anys, amb característiques de resposta humoral lleugerament diferents a les de l'inici clínic en adults, i amb una major agressivitat de la malaltia i una manca aparent de fase de lluna de mel [345]. En aquest rang d'edat, la incidència de la DT1 està augmentant especialment, probablement degut a factors ambientals [15]. En el model murí

amb expressió d'IFN β als illots es dona una resposta autoimmunitària agressiva i accelerada. Aquesta està mediada per cèl.lules NK, efectores de la immunitat innata [164]. Curiosament, un estudi en pacients amb DT1 va mostrar la presència de proteïnes de Coxsackievirus B4 i d'IFN α als illots pancreàtics en tres casos clínics, de forma concordant amb una insulitis no destructiva dominada per cèl.lules NK [63]. Aquest tipus d'insulitis contrasta amb la insulitis destructiva clàssica dominada per limfòcits T, descrita en la majoria dels casos estudiats fins al moment. Podria ser, per tant, que un factor desencadenant de tipus víric/proinflamatori promoués un tipus de DT1 més agressiva dominada per la immunitat innata. La soca NOD RIP-IFN β , amb un factor antiviral als illots com a desencadenant, podria ser-ne un bon model.

En la DT1 s'ha atorgat un paper patogènic a les citocines de tipus Th1 (IFN γ , IL-12) i proinflamatòries (IL-1 β , TNF α , IL-6 i IFN α) i un paper protector a les de citocines Th2 (IL-4) i a les produïdes per Tregs (TGF β) [292]. En el ratolí NOD s'ha constatat que els limfòcits T CD4⁺ Th1 infiltraven els illots més ràpidament que els Th2 [346]. A més, en aquest model s'ha associat la presència de quimiocines associades a un perfil de tipus Th1 (CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL5) amb la insulitis destructiva. Cal matisar que això és vàlid en termes generals però que algunes citocines poden mostrar efectes oposats segons la seva concentració, moment i localització [292, 347]. Els nostres resultats indiquen que en el model NOD, l'expressió insular d'IFN β promou un augment en l'expressió intrapancreàtica de citocines proinflamatòries i quimiocines de tipus Th1 atraients de limfòcits T i cèl.lules NK. Una d'elles, CXCL10 (o IP-10), és una quimiocina induïble per IFN β i en infeccions víriques, atraient de limfòcits T, cèl.lules NK i monòcits. A més, se sap que aquesta pot ser secretada per les pròpies cèl.lules β en condicions d'inflamació [348]. CXCL10 s'havia associat ja al desencadenament de la DT1 en un model viral: la soca RIP-NP amb DT1 induïda pel virus de la limfocoriomeningitis (LCMV) [174]. En mostres de pacients amb DT1 fulminant, s'ha observat que les cèl.lules endocrines presenten positivitat per proteïnes d'enterovirus. Algunes cèl.lules endocrines d'aquests pacients co-expressen CXCL10 i IFN γ i es troben envoltades per cèl.lules mononuclears infiltrants CXCR3⁺. S'ha proposat per tant un circuit on la inducció de l'expressió de CXCL10 i IFN γ a les cèl.lules endocrines per part d'una infecció vírica en promouria la seva destrucció [67]. En la DT1 accelerada per IFN β , podria donar-se un mecanisme semblant. Una altra de les quimiocines intrapancreàtiques augmentades és CCL5 (o RANTES), també induïble per IFN β [349] i amb capacitat per induir la funció citolítica de les cèl.lules NK i dels limfòcits T [350]. La citocina de tipus IL-12, augmentada en el model transgènic, promou la polarització cap a una resposta Th1 i l'activitat citotòxica de limfòcits T i cèl.lules NK [351]. Aquestes quimiocines i citocines de tipus Th1 observades en la insulitis agressiva junt amb el propi IFN β podrien desencadenar el reclutament massiu cap al pàncrees de cèl.lules NK, la seva activació i capacitat de producció d'IFN γ [352]. Les cèl.lules NK podrien contribuir a la DT1 accelerada polaritzant la resposta Th1 a través de la producció d'IFN γ , amb tendència a l'augment en pàncrees en el model transgènic. A més, en la DT1 accelerada per IFN β també vam detectar un augment significatiu d'IL-5 i IL-

17, indicant un perfil Th de tipus mixt a la insulitis agressiva. Aquest perfil mixt concorda amb dades d'un treball recent en el qual es demostra que l'ablació cel.lular dirigida contra Tregs promou una DT1 agressiva. Com a mecanismes efectors, es donen una expansió de cèl.lules NK intrapancreàtiques productores de grans quantitats d'IFN γ i un augment de trànscrips de respostes tant Th1 com Th17 [353].

Les citocines són factors pleiotròpics amb funcions molt diverses, tant dins com fora del sistema immunitari. Les citocines proinflamatòries IL-6 i IFN γ són presents en la insulitis en el model NOD i mostren una tendència a l'augment en el model NOD RIP-IFN β . Tant IL-6 com IFN γ són capaces d'induir una hiperplàsia quan s'expressen als illots pancreàtics, tal com s'ha observat mitjançant els models transgènics RIP-IL-6 i RIP-IFN γ [354, 355]. En la soca NOD s'ha descrit també una lleugera hiperplàsia insular associada a l'aparició d'APCs a l'inici de la insulitis [285, 356]. En el model transgènic RIP-IFN β vam observar una hiperplàsia insular en 3 fons genètics diferents. Aquesta hiperplàsia era deguda a un major nombre de cèl.lules β per illot, descartant diferències en l'àrea de les cèl.lules β i en la densitat cel.lular. Cal aclarir però que no es van observar ni obesitat ni alteracions metabòliques en les soques transgèniques [181]. La hiperplàsia insular d'aquest model transgènic pot semblar un fet contradictori, tenint en compte l'efecte antiproliferatiu atribuït a l'IFN β [185]. De fet, l'efecte directe de l'IFN β en la proliferació de cèl.lules β va ser descartat mitjançant experiments de proliferació *in vitro* en la línia NIT-1 exposada a la citocina antiviral (resultats no mostrats). Això indica que als illots del model de DT1 mediada per IFN β pot haver-hi alteracions d'altres factors proliferatius induïbles en condicions proinflamatòries/antivirals.

La família Reg és una família de factors de proliferació implicats en la regeneració de cèl.lules β . Els gens de la família Reg són induïbles en condicions d'inflamació [221]. En el nostre estudi vam observar la inducció de *Reg2* als illots pancreàtics en el model transgènic RIP-IFN β . La sobreexpressió de *Reg2* es donava tant en ratolins en fase de pre-diabetis com en animals diabètics. D'altres autors també han detectat un augment de gens de la família Reg - del grup III- en d'altres models murins de DT1 coincidint amb l'aparició de la insulitis [142, 205]. Tot i que no podem afirmar que *Reg2* sigui la causa directa de la hiperplàsia insular del model RIP-IFN β , probablement hi contribueix.

En el model RIP-IFN β , possiblement tant la citocina antiviral com la presència d'insulitis tinguin un efecte sinèrgic en la inducció de *Reg2*. D'una banda, l'expressió transgènica d'IFN β en fons genètic NOD.Scid -model lliure d'insulitis- causa una inducció menor de *Reg2* que en fons genètic NOD. A més, com ja s'ha esmentat, l'aparició de la insulitis ha estat associada amb l'aparició d'illots hiperplàsics en els ratolins NOD [356]. Tot i així, la insulitis per sí sola tampoc explicava l'augment de *Reg*: en illots de ratolins NOD amb insulitis avançada no es va detectar inducció de *Reg1* ni de *Reg2* (dades no mostrades). A més, es va demostrar que l'IFN β té un efecte *per se* en la inducció de *Reg1* i *Reg2* mitjançant l'exposició d'una línia cel.lular β a IFN β *in vitro*. Aquest efecte podria ser directe, ja que el promotor d'altres gens de la família Reg

conté motius d'unió a factors de la via dels IFNs (IRFs) [236, 238]. També podria ser un efecte mediat per citocines presents en la insulitis agressiva. Casualment, les citocines associades a hiperplàsia insular IL-6 i IFN γ són inductores de l'expressió de Reg [221, 245]. A més, en el nostre estudi es va observar que l'expressió d'IL-6 augmentava en paral·lel amb *Reg1* i *Reg2*. En conjunt, les citocines proinflamatòries IFN β , IL-6 i IFN γ presents en la insulitis, a més de promoure la destrucció de les cèl·lules β , podrien alhora activar mecanismes d'intent de regeneració.

Un dels efectes colaterals d'un estímul antiviral als illots sembla ser per tant l'intent de regeneració de cèl·lules β mediat per la inducció de Reg. Però cal tenir en compte un altre aspecte important de la família Reg: el seu paper com a autoantígens en la DT1. En l'estudi d'una cohort de pacients amb DT1 es van detectar autoanticossos contra REG1 α en el 25% d'aquests [229]. El paper de Reg com a autoantigen també s'ha suggerit en el model NOD. Es va observar que un clon de limfòcits T CD4⁺ diabetogènics provinent d'un ratolí NOD era capaç de reconèixer REG3 α [234]. També s'ha constatat el paper de Reg2 com a autoantigen en aquest model experimental. S'ha observat una acceleració de la DT1 mitjançant la immunització amb la fracció N-terminal de Reg2 i un retard amb la fracció C-terminal associat a una resposta mediada per Tregs [234]. Per tant, l'augment d'aquest factor de regeneració a les cèl·lules β podria estar en el fons promovent la resposta autoimmunitària, establint un "cercle viciós" de regeneració i destrucció. En el futur, es pretén analitzar el paper de REG com a autoantigen en pacients amb DT1. Actualment s'estan intentant desenvolupar mètodes per determinar la possible utilitat dels autoanticossos contra els diversos membres de la família REG com a biomarcadors en la DT1.

Alguns antígens tissulars perifèrics (PTAs) s'expressen de forma ectòpica a les mTECs del timus i a les cèl·lules estromals dels òrgans limfoides secundaris, com a mecanisme per generar tolerància enfront a aquests antígens [124]. Per exemple, REG3G s'expressa al timus, de forma dependent d'Aire, i en òrgans limfoides secundaris [128]. Vam realitzar experiments preliminars (no mostrats) per detectar possibles diferències d'expressió gènica de Reg al timus de ratolins C57BL/6J (resistents a la DT1), NOD i NOD RIP-IFN β . Tant *Reg1* com *Reg2* s'expressen al timus, tot i que el nivell d'expressió de *Reg2* va resultar superior al de *Reg1*. Aquesta diferència podria influir en el fet que *Reg2* sigui un autoantigen en la DT1 murina. No es van obtenir diferències significatives entre soques, tot i que l'expressió de *Reg2* va mostrar una tendència lleugerament més alta en la soca NOD RIP-IFN β . Aquest fet probablement és degut a la lleugera expressió d'IFN β detectada al timus d'aquests ratolins, ja que l'expressió del transgèn s'indueix sota el control del promotor d'insulina RIP i la insulina s'expressa al timus en petites quantitats [181]. Podria ser interessant analitzar els mecanismes de tolerància central i perifèrica enfront Reg en els models C57BL/6J, NOD i NOD RIP-IFN β més a fons per determinar si existeixen diferències d'expressió de *Reg2* al timus i/o als nòduls limfoides pancreàtics que condicionin al seu paper com a autoantigen.

En el model NOD RIP-IFN β la DT1 es dona de forma accelerada i agressiva. La inducció insular de Reg2 observada podria inicialment promoure la proliferació β per intentar regenerar la massa cel·lular β destruïda, però tenir finalment conseqüències oposades, contribuint com a autoantigen a l'acceleració de la malaltia. En pàncrees de pacients amb DT1 s'ha detectat l'expressió d'IFN α i IFN β [46, 47]. En els casos de pacients amb DT1 analitzats en el nostre estudi també es dona una sobreexpressió de gens de la família REG en pàncrees i illots, i de gens de resposta a IFN. La inducció de REG mitjançant IFN β i/o altres citocines presents en el microambient inflamatori dels illots podria ser determinant en la DT1 humana i experimental, promovent alhora la regeneració β i l'autoimmunitat.

4. CONSIDERACIONS FINALS

En el present estudi hem identificat noves alteracions presents al pàncrees i als illots en pacients i en un model experimental de DT1 accelerada. Els models experimentals com la soca NOD permeten caracteritzar els illots pancreàtics en fases de pre-diabetis i DT1. La soca derivada NOD RIP-IFN β , generada pel nostre grup ens ha permès estudiar les alteracions de l'òrgan diana en un tipus de DT1 més agressiva, promoguda per la presència d'un factor antiviral als illots. Mitjançant aquest model hem observat que l'IFN β promou la producció local de citocines i quimiocines proinflamatòries al pàncrees, l'acceleració de la DT1 mediada per cèl·lules NK [164] i la inducció de gens de regeneració de la família Reg als illots. No obstant, les característiques de la diabetogènesi en models experimentals murins no sempre són extrapolables a les del procés en pacients, ja que la DT1 humana i l'experimental difereixen en aspectes com el grau i la composició de la insulitis. Per tant, segueix sent imprescindible caracteritzar les alteracions a l'òrgan diana de la DT1 en humans afectats. La primera base de dades dels perfils d'expressió gènica del pàncrees i dels illots de pacients amb DT1 descrita aporta nova informació sobre els múltiples processos que tenen lloc durant la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β . El nostre estudi posa de manifest nous aspectes, com la magnitud dels processos inflamatoris, de la resposta innata i l'intent d'immunoregulació en pàncrees a (l'inici i en fases cròniques de la malaltia), l'afectació dels sistemes nerviosos i exocrí, l'heterogeneïtat de la resposta en fases de llarga evolució (possibles fases de resposta-remissió) i la tendència a l'augment de MMc en pàncrees de pacients diabètics. Mitjançant la biologia de sistemes [305], es podran integrar dades de diferents aproximacions experimentals i cercar perfils comuns amb d'altres malalties autoimmunitàries. A més, les alteracions immunològiques descrites suggereixen possibles factors candidats per la identificació de biomarcadors de la malaltia, de predicció en individus amb risc o de seguiment després d'una immunoteràpia o transplantament d'illots/pàncrees. Els perfils d'expressió i les noves alteracions identificades al teixit diana de la DT1 permetran generar nous enfocaments i hipòtesis sobre els mecanismes implicats en la patogènia d'aquesta i d'altres malalties autoimmunitàries.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Els perfils d'expressió gènica corresponents a la primera base de dades del transcriptoma de l'òrgan diana de la DT1 humana confirmen alteracions immunològiques i endocrines prèviament descrites i alhora indiquen nous factors implicats en l'inici i en la cronificació de la malaltia:
 - 1.1 Els gens sobreexpressats a l'òrgan diana de la DT1 correlacionen amb la presència d'un infiltrat leucocitari als illots i estan implicats principalment en processos de la resposta immunitària. Les vies funcionals alterades confirmen la contribució de gens de presentació antigènica, subpoblacions leucocitàries, immunoglobulines, molècules d'adhesió en la DT1 al pàncrees. A més, s'han descrit noves alteracions de trànscripats implicats en quimiotaxi, inflamació i factors de la immunitat innata, sistema del complement, gens de resposta a IFNs i d'immunoregulació. Aquestes variacions transcripcionals s'observen de forma més evident en pàncrees total que en illots purificats.
 - 1.2 Als illots pancreàtics de pacients amb DT1 hi ha una disminució de trànscripats propis de cèl.lula β , però també una desregulació de trànscripats d'altres tipus cel.lulars endocrins, una reducció de l'expressió de gens propis del sistema nerviós i una sobreexpressió de gens de regeneració.
 - 1.3 El teixit exocrí mostra una reducció de trànscripats d'enzims digestius a la fase d'inici de la malaltia, junt amb la producció de factors inflamatoris i implicats en la resposta immunitària.
 - 1.4 El transcriptoma del teixit diana mostra alteracions comunes en els quatre casos analitzats però alhora revela importants diferències interindividuals, remarcant l'heterogeneïtat de la resposta autoimmunitària en els pacients amb DT1.
 - 1.5 La resposta autoimmunitària es manté activa en fases avançades de la DT1. En aquestes fases s'observa encara la destrucció β donada per la presència d'insulinitis i l'augment d'expressió de gens del sistema immunitari. A més, es detecta la presència de cèl.lules β esporàdiques i la sobreexpressió de gens de regeneració i immunoregulació, establint una resposta autoimmunitària balancejada i persistent.

2. Als illots pancreàtics humans hi ha cèl·lules β d'origen matern. La freqüència de cèl·lules maternes en pàncrees de pacients amb DT1 mostra una tendència a l'augment en comparació amb individus control.
3. El model NOD RIP-IFN β defineix possibles vies per les quals un estímul antiviral i proinflamatori contribueix localment a la destrucció autoimmunitària i la regeneració de les cèl·lules β pancreàtiques:
 - 3.1 L'IFN β augmenta l'expressió pancreàtica de citocines de tipus Th1, Th2 i Th17 i quimiocines implicades en la migració de limfòcits T i cèl·lules NK.
 - 3.2. L'IFN β indueix l'expressió de Reg2 –factor de regeneració i autoantígen- a les cèl·lules β , correlacionant amb un augment d'IL-6 (inductor de Reg), amb una hiperplàsia insular i amb l'acceleració de la malaltia.
4. La destrucció autoimmunitària del teixit diana tant en la DT1 humana com en l'experimental és un procés extraordinàriament més complex del que s'havia descrit fins ara, en quant a la diversitat de processos immunològics i la capacitat d'activació de mecanismes compensatoris. La coexistència d'aquests factors resulta en una autoimmunitat crònica.

**PUBLICACIONES DERIVADAS
DE L'ETAPA PRE-DOCTORAL**

PUBLICACIONS DERIVADES DE L'ETAPA PRE-DOCTORAL

ARTICLES ORIGINALS

A. Alba, M. C. Puertas, J. Carrillo, **R. Planas**, R. Ampudia, X. Pastor, F. Bosch, R. Pujol-Borrell, J. Verdaguer, M. Vives-Pi. *The transgenic expression of IFN beta in islet beta cells breaks the tolerance in non-diabetes prone strains and accelerates autoimmune type 1 diabetes in NOD mice.* J Immunol 173:6667-75, 2004

J. Carrillo, MC. Puertas, A. Alba, RM. Ampudia, X. Pastor, **R. Planas**, N. Riutort, N. Alonso, R. Pujol-Borrell, P. Santamaria, M. Vives-Pi, J. Verdaguer. *Islet infiltrating B-cells in non-obese diabetic mice predominantly target nervous system elements.* Diabetes 54(1):69-77, 2005

R. Planas, A. Alba, J. Carrillo, MC. Puertas, R. Ampudia, X. Pastor, H. Okamoto, S. Takasawa, W. Gurr, R. Pujol-Borrell, J. Verdaguer, M. Vives-Pi. *Regenerating gene overexpression in islets from NOD with accelerated diabetes: role of IFN β .* Diabetologia, 49(10):2379-87, 2006

M. C. Puertas, J. Carrillo, X. Pastor, R. M. Ampudia, A. Alba A, **R. Planas**, R. Pujol-Borrell, M. Vives-Pi, J. Verdaguer. *Phenotype and Functional Characteristics of Islet-Infiltrating B-Cells Suggest the Existence of Immune Regulatory Mechanisms in Islet Milieu* Diabetes 56:940–949, 2007

M. C. Puertas, J. Carrillo, X. Pastor, R.M. Ampudia, **R. Planas**, A. Alba, R. Bruno, R. Pujol-Borrell, J. M. Estanyol, M. Vives Pi, J. Verdaguer. *Peripherin is a major neuroendocrine autoantigen recognized by islet-infiltrating B-lymphocytes in NOD mice.* J Immunol 15;178(10):6533-9, 2007

A. Alba, **R. Planas**, X. Clemente, J. Carrillo, R. Ampudia, M. C. Puertas, X. Pastor, E. Tolosa, R. Pujol-Borrell, J. Verdaguer, M. Vives-Pi. *Type 1 diabetes accelerated by IFN-beta is driven by natural killer cells.* Clin Exp Immunol 151:467-475, 2008

J. Carrillo, M. C. Puertas, **R. Planas**, X. Pastor, A. Alba, T. Stratmann, R. Pujol-Borrell, R. M. Ampudia, M. Vives-Pi, J. Verdaguer. *Anti-peripherin B lymphocytes are positively selected during diabetogenesis.* Molecular Immunology 45:3156-3162, 2008

R. Planas, J. Carrillo, A. Sanchez, M. C. Ruiz de Villa, F. Nuñez, J. Verdaguer, R. Pujol-Borrell, M. Vives-Pi. *Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in Type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in longstanding diabetes*. Clin Exp Immunol, 159:23-44, 2010. (Imatge de la publicació figurant a la portada del volum corresponent de la revista).

S. Marin-Gallen, X. Clemente-Casares, **R. Planas**, J. Carrascal, I. Pujol-Autonell, J. Carrillo, R. Ampudia, J. Verdaguer, R. Pujol-Borrell, F. E. Borràs, M. Vives-Pi. *Dendritic cells pulsed with antigen-specific apoptotic bodies prevent experimental Type 1 diabetes*. Clin Exp Immunol, 2010 (en premsa, PMID:20030670)

CAPÍTOLS DE LLIBRE

M. Vives-Pi, A. Lucas, **R. Planas**. *Alteraciones inmunológicas en los islotes de pacientes con diabetes mellitus tipo 1*. Capítol 2 de la Monografía "El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes", Editorial de la Sociedad Española de Diabetes, 2007

REVISIONS

A. Alba, **R. Planas**, J. Verdaguer, M. Vives-Pi. *Viral infections and autoimmune diabetes*. Inmunología 24(1):33-43, 2005

R. Planas, M. Vives-Pi. *Tolerance, Autoimmunity and Immune Regulation: Report from the Keystone Symposia, Breckenridge, Colorado (USA)*. Inmunología 25(2):142-146, 2006

Reg (regenerating) gene overexpression in islets from non-obese diabetic mice with accelerated diabetes: role of IFN β

R. Planas · A. Alba · J. Carrillo · M. C. Puertas ·
R. Ampudia · X. Pastor · H. Okamoto · S. Takasawa ·
W. Gurr · R. Pujol-Borrell · J. Verdaguer · M. Vives-Pi

Received: 30 March 2006 / Accepted: 1 June 2006 / Published online: 10 August 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract

Aims/hypothesis The expression of IFN β in beta cells results in accelerated type 1 diabetes. The REG family of beta cell proliferation factors have been described as autoantigens in autoimmune diabetes. The aim of this study was to determine the effect of IFN β on *Reg* expression, and the implications of this in terms of autoimmunity.

Methods *Reg* gene expression was determined in islets from non-obese diabetic (NOD) RIP-HuIFN β mice by cDNA microarray, quantitative real-time PCR and immunohistochemistry. The effect of IFN β on *Reg1* and *Reg2* expression was assessed in the NOD insulinoma cell line NIT-1. IL-6, known to induce *Reg* expression, was measured in the insulinitis microenvironment. Morphological studies were carried out to determine islet enlargement in this model.

Results *Reg2* was upregulated in islets from the NOD RIP-HuIFN β mice at the onset of the autoimmune attack. IFN β upregulates *Reg1* and *Reg2* genes in NIT-1 cells. The expression of *Il6* was increased in islets from transgenic mice and in NIT-1 cells exposed to HuIFN β . Moreover, islets from transgenic mice were enlarged compared with those from wild-type mice.

Conclusions/interpretation *Reg* overexpression correlates well with the acceleration of diabetes in this model. The upregulation of *Reg* suggests that islets try to improve hyperglycaemia by regenerating the cells lost in the autoimmune attack. *Reg* expression is regulated by several factors such as inflammation. Therefore, the overexpression of an IFN β -induced autoantigen (REG) in the islets during inflammation might contribute to the premature onset of diabetes.

Keywords Diabetes · IFN β · Islets · NOD mice · REG · Regenerating gene

Abbreviations

H/E haematoxylin and eosin
IIF indirect immunofluorescence
NOD non-obese diabetic
SCID severe combined immune deficiency

Introduction

Type 1 diabetes results from a combination of genetic, immunological and environmental factors [1]. Although the aetiology of the disease is believed to have a major genetic component, environmental factors, such as viruses, may be determinants [2–4]. Type I interferons—antiviral cytokines—are mediators in type 1 diabetes [5–7]. The trans-

H. Okamoto
Department of Advanced Biological Sciences for Regeneration,
Tohoku University Graduate School of Medicine,
Sendai, Miyagi, Japan

S. Takasawa
Department of Biochemistry,
Tohoku University Graduate School of Medicine,
Sendai, Miyagi, Japan

W. Gurr
Section of Endocrinology, Yale University School of Medicine,
New Haven, CT, USA

R. Planas · A. Alba · J. Carrillo · M. C. Puertas · R. Ampudia ·
X. Pastor · R. Pujol-Borrell · J. Verdaguer · M. Vives-Pi (✉)
Laboratory of Immunobiology for Research
and Diagnostic Applications (LIRAD), Blood and Tissue Bank,
Germans Trias i Pujol University Hospital,
P.O. Box 72, 08916 Badalona, Barcelona, Spain
e-mail: mvives.liradbst.germantrias@gencat.net

genic expression of the human gene for IFN β (HuIFN β) in islet beta cells [8] accelerates autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice [9] and breaks the tolerance in non-diabetes prone strains. In this paper we report that the beta cell regeneration factor REG, also described as a diabetes autoantigen [10, 11] is overexpressed in islets from RIP-HuIFN β transgenic mice.

Regenerating gene (*Reg*) was isolated from a cDNA library of rat regenerating islets [12]. REG family proteins, involved in liver, pancreatic, gastric and intestinal cell proliferation, belong to a conserved protein family sharing structural and functional properties. The increase of *Reg* expression in cancer [13, 14], inflammatory bowel disease [15] and autoimmune diabetes [10] could promote cell growth.

In mice, *Reg1* and *Reg2* genes encode proteins expressed in the pancreatic exocrine tissue and in regenerating islets [16, 17]. After partial pancreatectomy, experimental diabetes is improved by administering REG [18]. NOD mice expressing *Reg1* in beta cells show a delay in the onset of diabetes [19], whereas islets from *Reg* knockout mice showed a lower proliferative response [19]. Moreover, in NOD mice, diabetes improves following the administration of REG [20]. HIP/PAP, a REG family protein, is overexpressed in islets from patients with recent-onset type 1 diabetes and acts as T-cell autoantigen in NOD mice [10]. Type 1 and type 2 diabetes patients have autoantibodies to REG that delay beta cell proliferation [11]. Although *Reg* upregulation may reflect the effort of the islets in trying to repair the destruction of beta cells, REG proteins may act as autoantigens contributing to activate lymphocytes against REG, off-balancing the loss and generation of beta cells, and influencing diabetes onset.

Factors like nicotinamide, glucocorticoids, diet [21] and IL-6 [10], IL-8 [22] and IFN γ cytokines [14] regulate *Reg* expression. Our hypothesis is that an initial inflammation driven by IFN β can upregulate *Reg* genes in an attempt to regenerate beta cells, possibly contributing to accelerate autoimmunity. In this study, we compared the expression of *Reg* genes in NOD mice and NOD RIP-HuIFN β transgenic mice (a model of accelerated autoimmune diabetes) and correlated them with alterations in islet morphology.

Materials and methods

Cell lines

The NOD insulinoma cell line NIT-1 (CRL-2055; ATCC, Manassas, VA, USA) was cultured as described [23] and supplemented with HuIFN β (50,000 U/ml; Betaferon; Schering, Madrid, Spain) for 72 h. To confirm the effect of HuIFN β , MHC class I production was assessed by flow

cytometry [24] with an anti-MHC class I antibody (H-2, M1/42.3.9.8.HKJ/TIB-126; ATCC) and an FITC-labelled goat anti-rat secondary antibody (SBA, Birmingham, AL, USA). Data were analysed with a FACScan Cell Analyzer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and CellQuest software (BD Biosciences).

Animals

Transgenic mice expressing the human gene for IFN β under the control of the rat insulin I promoter (RIP-HuIFN β) were generated by backcrossing the original C57BL/6/SJL RIP-HuIFN β transgenic mice with CD-1 mice [25]. NOD and NOD-severe combined immune deficiency (SCID) mice [26]—unable to produce mature T and B lymphocytes—were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Transgenic NOD mice were generated by backcrossing CD-1 RIP-HuIFN β ten times to the NOD background. The acquisition of the genetic background was controlled by the analysis of microsatellites [8]. NOD RIP-HuIFN β mice were crossed onto the NOD-SCID strain to generate NOD-SCID RIP-HuIFN β . Non-transgenic littermates were used as controls for each strain of mice. Only female mice were analysed in this study. Mice were kept under specific pathogen-free conditions in a 12-h light–darkness cycle with free access to standard diet. For diabetes assessment, mice were monitored daily for glycosuria (Chroma 1 Glucose strips; Menarini, Barcelona, Spain). Principles of laboratory animal care (NIH publication) and the guidelines for the use and care of laboratory animals of the Generalitat de Catalunya (Spain) were followed.

Insulinitis score

To determine the degree of insulinitis, pancreases were snap frozen in an isopentane/cold acetone bath. Five μ m cryostat sections performed at five non-overlapping levels were stained with haematoxylin and eosin (H/E). Groups of three to six mice were analysed at the age of 4 and 14 weeks, assessing a minimum of 20 islets per mouse. Insulinitis was scored as described elsewhere [27]: 0, no insulinitis; 1, peri-insular; 2, mild insulinitis (<25% of the infiltrated islet); 3, 25–75% of the islet infiltrated; 4, total islet infiltration.

Islet isolation and purification

Pancreases were digested with collagenase (Worthington, Lakewood, NJ, USA) and islets were hand picked under a stereomicroscope as described [28]. To prepare cytosmears, freshly isolated islets were mechanically disrupted and centrifuged onto glass slides [29].

cDNA microarray

Total RNA was extracted from islets with TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) and treated with DNase (Ambion, Houston, TX, USA). RNA samples were pooled (three to five animals per condition) and purified with RNeasy Minelute Cleanup (Qiagen, Hilden, Germany). RNA integrity was assessed by electrophoresis in a denaturing 1% agarose gel. Fifteen micrograms of total RNA were reverse transcribed and directly labelled with Cy3- or Cy5-nucleotides with a CyScribe First Strand cDNA labelling kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Labelled cDNA was purified in a CyScribe GFX column (Amersham Biosciences). *Escherichia coli* transcripts (Memorec; Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) were included in the reverse transcription reaction as controls of the labelling process. Labelled cDNAs were hybridised in cDNA microarrays (Memorec) designed by our group with 200 diabetes and autoimmunity-related genes, spotted $\times 4$. Hybridisations were performed at 62°C for 16 h following the manufacturer's instructions. After washing, microarrays were scanned (ScanArray 4000; GSI Lumonics, Boston, MA, USA) and normalised to *E. coli* control spots using QuantArray software (GSI Lumonics). Hybridisations were performed in triplicate, including a dye-swap. To test for statistical significance, data were expressed as the mean value of the \log_2 ratio between normalised intensities of samples from transgenic islets and from wild-type islets. Differential expression was considered significant when the *p* value for a one-sample *t*-test was <0.01 , considering all spots ($n=12$ spots, three arrays with four internal replicate spots per array, passing normality test).

Laser-capture microdissection

A laser-capture microdissection technique was performed to obtain islets from diabetic mice which were very difficult to hand pick. Pancreatic cryostat sections (6 μm) were settled on P.A.L.M. slides (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Germany) and stained with H/E. Islets were microdissected (P.A.L.M. Microlaser Technologies) on a Zeiss microscope.

Real-time RT-PCR

RNA was extracted from islets (hand-picked or microdissected) with RNeasy Micro (Qiagen). RNA from NIT-1 cells was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen) and treated with DNase (Ambion). RNA was denatured and random hexamer was added. Then, RNA from hand-picked islets was reverse transcribed by using Moloney murine leukaemia virus (MMLV) reverse transcriptase (200 U/ μl ; Promega, Southampton, UK) in a reaction including

MMLV 1 \times RT-buffer, 1 mmol/l dNTPs and RNAsin (40 U/ μl) (Promega). RNA from microdissected islets was reverse transcribed by using SuperScript II (200 U/ μl) (Invitrogen) in a reaction including 1 \times RT-buffer, 10 mmol/l dithiothreitol, 2 mmol/l dNTPs and RNAsin (40 U/ μl) (Promega) at 42°C and 70°C for 60 and 15 min, respectively. Real-time PCR was performed using an ABI 7900 System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using Taqman primers and probes for *Reg1*, *Reg2*, *Il6*, *Ins2*, *Rn18s* and *Gapdh*. Relative values were determined by normalising the expression for each gene of interest to a housekeeping gene (*Rn18s* or *Gapdh*) and to a calibrator sample (mRNA from islets from NOD-SCID mice or untreated NIT-1 cells), as described in the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [30].

Morphological analysis

The islet area from CD-1, NOD and NOD-SCID mice (4 weeks old, $n=12$ transgenic mice and $n=10$ controls) was assessed by the point-count method as reported elsewhere [31] and analysed in an image analyser (OpenLab 2.0; Improvision, Coventry, UK). Pancreatic sections (5 μm) were stained with H/E. Islet area was determined (OpenLab 2.0) only taking into account the endocrine tissue. A minimum of 20 islets per animal was analysed. The size of beta cells was determined by measuring the area after specific staining with anti-glucagon, somatostatin and pancreatic polypeptide (Dako, Carpinteria, CA, USA) as described [32] in a minimum of 20 islets per condition.

Immunohistochemistry

Consecutive pancreatic cryostat sections (5 μm) were sequentially stained by indirect immunofluorescence (IIF) with: (1) antibodies to REG1 (mouse monoclonal IgG2a [16] and REG2 (rabbit polyclonal IgG to REG2); (2) labelled goat anti-mouse Alexa 488 IgG2a (ICN, Aurora, OH, USA) or FITC-goat anti-rabbit (SBA); (3) guinea-pig anti-insulin (ICN) and (4) tetramethyl rhodamine isothiocyanate-labelled goat anti-guinea pig (ICN). The sections were observed in a fluorescence UV microscope and an image analyser (OpenLab 2.0). On cytosmears stained as described above, 100–200 beta cells—positive for insulin staining—were evaluated. To ensure specific staining of REG, control slides were stained without the primary antibody, which revealed no specific staining. Each IIF staining was performed in triplicate.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SE. Statistical analyses to compare independent groups were performed using a *t*-test when groups passed normality and showed equal variance

tests. Otherwise, a Mann–Whitney *U*-test was performed. Differences were considered significant when a value of <0.05 was reached ($p<0.01$ for microarray experiments).

Results

Reg2 mRNA is upregulated in NOD RIP-HuIFN β islets

To determine the effect of IFN β in the islets, we compared gene expression in islets from NOD RIP-HuIFN β mice with those from NOD mice at the age of 4 weeks, at the onset of the autoimmune attack. The cDNA microarray analysis showed that *Reg2* expression was higher in healthy NOD RIP-HuIFN β when compared with non-transgenic littermates ($p<0.0001$). As expected, *B2m* expression was also increased ($p<0.01$) (data from three independent experiments) (Table 1). However, other genes of autoantigens (*Gad1*, *Gad2* and *Ins1*) were not upregulated in transgenic animals (Table 1). Moreover, the gene expression of other islet molecules was not increased (glucagon, somatostatin and pancreatic polypeptide; data not shown). *Reg2* upregulation was confirmed by quantitative RT-PCR (Fig. 1): *Reg2* was 3.5-fold upregulated ($p<0.001$) in NOD RIP-HuIFN β when compared with NOD wild-type at the age of 4 weeks. *Reg2* upregulation was not detected in 14-week-old NOD mice when compared with 4-week-old healthy NOD mice (data not shown). *Reg1* was not altered (results from three different experiments).

Reg2 overexpression in diabetic RIP-HuIFN β mice

Islets from diabetic mice were obtained by laser-capture microdissection. RNA from microdissected islets was obtained for real-time RT-PCR. *Reg2* was overexpressed in islets from early-onset diabetic RIP-HuIFN β transgenic mice when compared with diabetic NOD mice (14.1-fold change, $p<0.05$) (Fig. 2). *Reg1* mRNA increase (3.4-fold) was not statistically significant. Since REG induces beta cell proliferation, *Ins2* expression was also determined. *Ins2* expression was higher in the islets from diabetic NOD

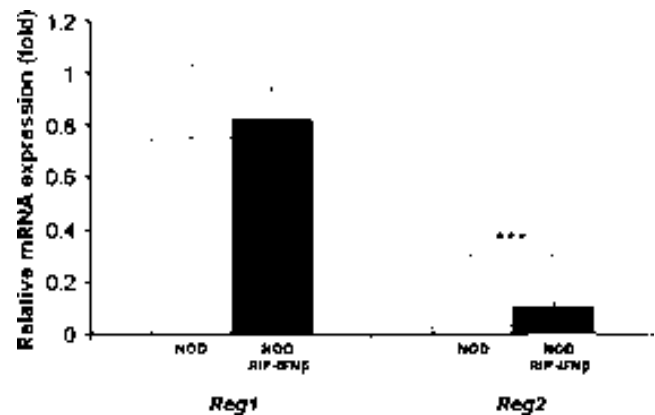


Fig. 1 Histogram of quantitative RT-PCR for *Reg1* and *Reg2* expression in islets from NOD (white bars) and NOD RIP-HuIFN β (black bars) non-diabetic mice (4 week old). Results from three experiments expressed as the relative mRNA expression of *Reg* to *Gapdh* compared with a calibrator sample (NOD-SCID islets). The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was followed. *** $p<0.001$

transgenic mice than in the islets from diabetic NOD wild-type (10.9-fold change, $p<0.05$), correlating with *Reg2* overexpression.

REG1 and REG2: immunohistology of the islets

We detected a clear increase of REG1 and REG2 expression in the islets from healthy NOD RIP-HuIFN β compared with healthy NOD mice at the age of 4 weeks (Fig. 3a). REG expression was markedly increased in diabetic transgenic mice compared with NOD diabetic mice. A weak increase in REG expression was also observed in the exocrine tissue from NOD RIP-HuIFN β in close contact with the islets. As positive control of the effect of HuIFN β , we determined the MHC class I hyperexpression in the islets from NOD RIP-HuIFN β as described elsewhere [8]. In order to correlate REG overexpression with the insulinitis score, we compared the staining pattern in healthy NOD animals with advanced insulinitis (14 weeks of age) with that of NOD mice with early insulinitis (4 weeks of age), but no differences were found; this was in agreement with our microarray results (data not shown). Moreover, REG2 expression was slightly

Table 1 Microarray experiments: gene expression in islets from NOD RIP-HuIFN β compared with NOD

UniGene code	Gene symbol	\log_2 ratio (mean \pm SE)	<i>p</i> value	Function
Mm. 46360	<i>Reg2</i>	3.48 \pm 0.14	<0.0001	Beta cell proliferation factor. Autoantigen in type 1 diabetes
Mm. 163	<i>B2m</i>	1.43 \pm 0.33	0.0034	Antigenic presentation restricted to MHC I (β 2-microglobulin)
Mm. 16620	<i>Gad1</i>	0.17 \pm 0.22	NS	GAD. Autoantigen in type 1 diabetes
Mm. 4784	<i>Gad2</i>	-0.31 \pm 0.24	0.23	GAD. Autoantigen in type 1 diabetes
Mm. 46269	<i>Ins1</i>	-0.47 \pm 0.07	<0.0001	Regulator of glucose metabolism. Autoantigen in type 1 diabetes
Mm. 5289	<i>Gapdh</i>	-0.26 \pm 0.10	NS	Housekeeping gene

All subjects were female, non-diabetic 4-week-old mice. Data are expressed as the mean of the \log_2 ratio between both samples. Differential expression was considered when the *p* value for a one-sample *t*-test was <0.01 ($n=12$ spots, four from each of three different experiments)

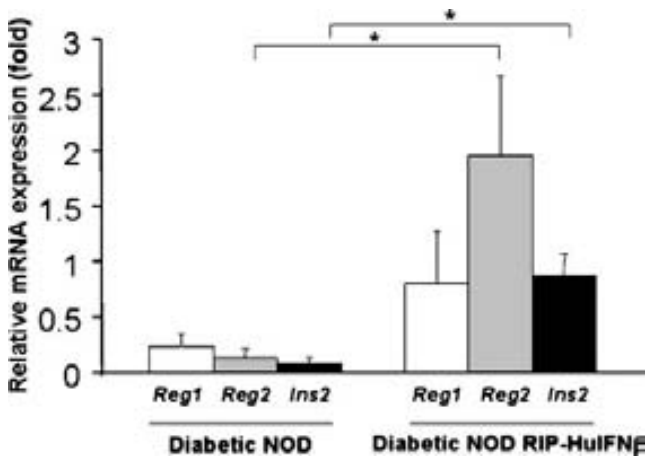


Fig. 2 Histogram of quantitative RT-PCR for *Reg1* and *Reg2* expression in microdissected islets from recent-onset diabetic mice (NOD and NOD RIP-HuIFN β). *Reg1* (white bars), *Reg2* (grey bars) and *Ins2* (black bars) expression was normalised to that of *Rn18s* RNA, and NOD-SCID islets were used as a calibrator. Results from three independent experiments. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was followed. * $p < 0.05$

increased in the islets from NOD-SCID RIP-HuIFN β mice compared with wild-type NOD-SCID mice (Fig. 3a). These mice have neither insulinitis nor diabetes, due to their lack of

functional lymphocytes, but hyperexpress MHC class I in the islets due to the effect of IFN β . In general, the staining pattern of REG agrees with that of insulin. To confirm co-localisation of REG and insulin, single islet cells were stained in cytosmears. REG2 and REG1 expression clearly co-localised to insulin staining (Fig. 3b), as described [16].

Insulinitis is not the only cause of *Reg2* hyperexpression

Since inflammation upregulates *Reg* expression, we assessed insulinitis score. Insulinitis score was statistically significantly higher in 4-week-old healthy NOD RIP-HuIFN β when compared with 4-week-old NOD mice ($p < 0.001$), and was well correlated with *Reg2* induction (Fig. 4). However, insulinitis was higher in 14-week-old NOD mice when compared with 4-week-old NOD mice ($p < 0.05$), but *Reg2* upregulation was not found when both groups of animals were compared.

Effect of IFN β per se on *Reg* expression

To confirm the effect of IFN β on *Reg* expression, the NOD insulinoma cell line NIT-1 was cultured with HuIFN β . The effect of the cytokine on NIT-1 cells was confirmed by

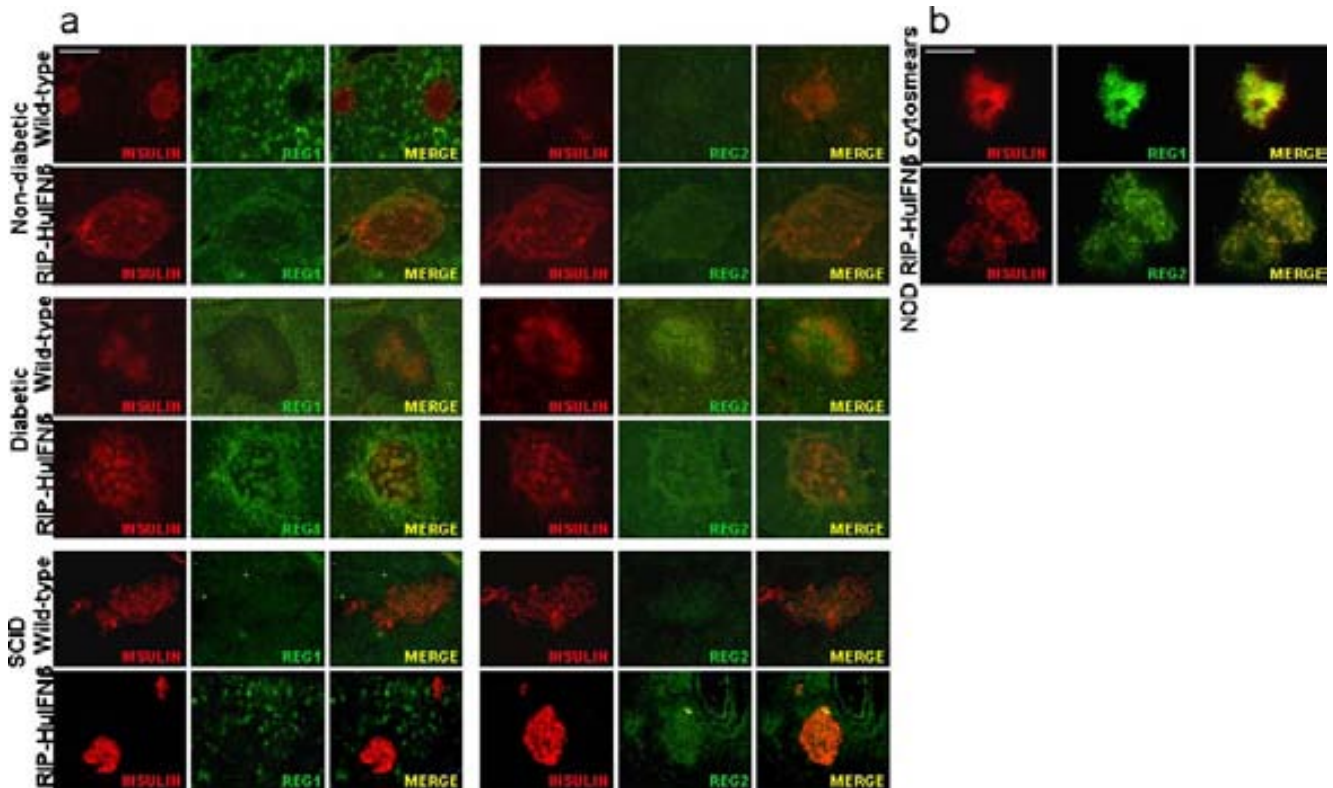


Fig. 3 REG1 and REG2 levels in the pancreatic islets. **a** Double IIF staining for REG (green) and insulin (red). REG1 (left panels) and REG2 (right panels) production in islets from NOD RIP-HuIFN β mice, as compared with those from NOD and NOD-SCID mice.

Magnification: $\times 200$; the bar represents 100 μm . **b** Double IIF staining in isolated beta cells from non-hyperglycaemic NOD RIP-HuIFN β mice. REG1 and REG2 levels (green) in insulin-positive cells (red). Magnification: $\times 1,000$; the bar represents 25 μm

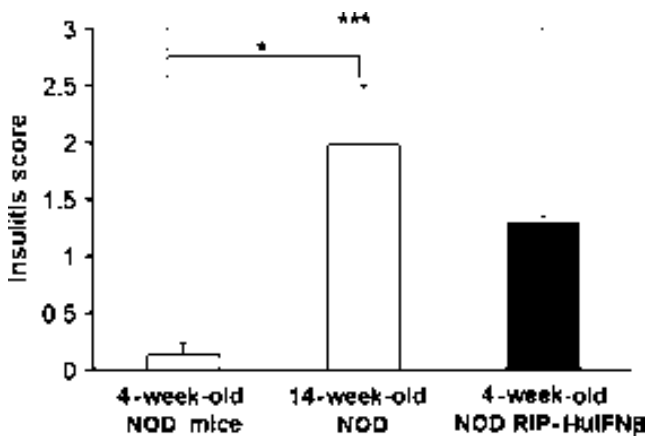


Fig. 4 Insulinitis score in NOD (white bars) and NOD RIP-HuIFN β (black bars) mice at the points studied by cDNA microarray analysis (3–6 animals per condition and 20 islets per animal). Islets from non-hyperglycaemic 14-week-old NOD females showed a significantly higher insulinitis score ($*p<0.05$) than at 4 weeks. There was also a significant difference ($***p<0.001$) between islet infiltration from NOD RIP-HuIFN β mice and wild-type NOD mice at the age of 4 weeks

assessing MHC class I overexpression in the membrane of NIT-1 cells (100.2 ± 19.6), which increased significantly after culturing with HuIFN β (439.4 ± 43) ($p<0.001$). Quantitative RT-PCR showed that HuIFN β upregulates the expression of *Reg1* (3.1-fold change, $p<0.05$) and *Reg2* (5.5-fold change, $p<0.001$) (Fig. 5) in the NIT-1 cell line (data from four independent experiments). Moreover, we compared *Reg* expression in the islets from NOD-SCID

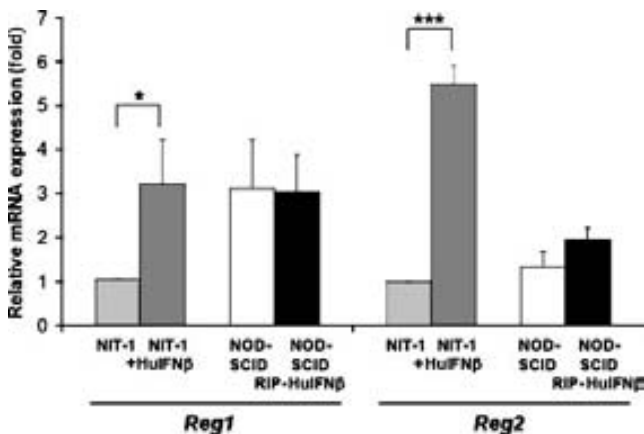


Fig. 5 Real-time RT-PCR analysis for *Reg1* and *Reg2* in the NIT-1 cell line and in NOD-SCID islets. Cells exposed to HuIFN β for 72 h showed a 3.9- ($*p<0.05$) and 5.48- ($***p<0.001$) fold increase in *Reg1* and *Reg2* mRNA, respectively, when compared with basal cultured NIT-1 cells (data from four independent experiments). NOD-SCID RIP-HuIFN β mice showed higher *Reg2* expression than NOD-SCID mice, but differences were not statistically significant. Results were normalised to *Gapdh* expression and compared with a calibrator (untreated NIT-1 cells and NOD-SCID islets, respectively). Light grey bars, NIT-1 cells (basal); dark grey bars, NIT-1 cells with HuIFN β ; white bars, NOD-SCID mice; black bars, islets from NOD-SCID RIP-HuIFN β transgenic mice

RIP-HuIFN β and NOD-SCID. Islets from NOD-SCID RIP-HuIFN β mice showed a slight *Reg2* upregulation (Fig. 5) compared with NOD-SCID, although differences were not statistically significant (data from three experiments).

Upregulation of *Il6*, a described enhancer of *Reg* promoter, by IFN β

As IFN β increases IL-6 production [33], IL-6 acts as an enhancer in the upstream region of *Reg* genes [17], and inflammatory cytokines are produced in the insulinitis, we determined *Il6* islet expression. NOD RIP-HuIFN β transgenic mice overexpressed *Il6* in the islets (12.1 ± 1.8) when compared with islets from NOD wild-type mice (2.8 ± 0.8) (4.3-fold change, $p<0.001$, data from three independent experiments) (Fig. 6). To evaluate the effect of HuIFN β while excluding that of insulinitis, we measured *Il6* expression in the islets from NOD-SCID RIP-HuIFN β and NOD-SCID mice. Islets from NOD-SCID RIP-HuIFN β mice showed a slightly increased *Il6* expression (Fig. 6) compared with NOD-SCID, although differences were not statistically significant (data from three experiments). The effect of HuIFN β on *Il6* expression was determined in NIT-1 cells: the expression of *Il6* increased in NIT-1 cells exposed to HuIFN β (2.5-fold change, $p<0.05$, data from four experiments). By using protein low-density arrays (a cytokine antibody array, a system to assess the expression profiles of multiple cytokines in pancreatic lysates; Raybiotech, Atlanta, GA, USA) we confirmed that the amounts of IL-6 in the pancreases from healthy and diabetic NOD RIP-HuIFN β

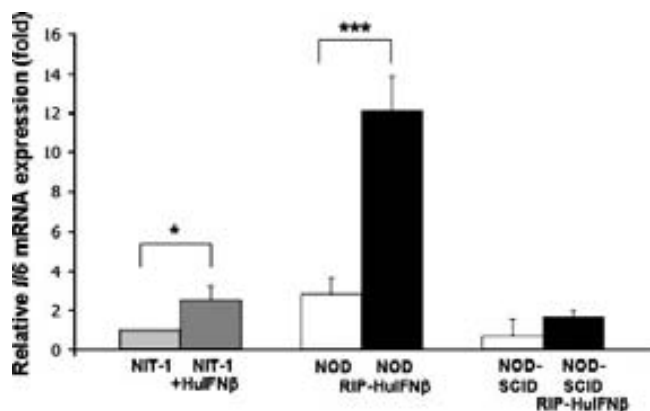


Fig. 6 Effect of IFN β on *Il6* mRNA expression. Real-time RT-PCR analysis for *Il6* mRNA in NIT-1 cells (basal or cultured with HuIFN β), and in NOD and NOD-SCID mice (transgenic and wild-type). *Il6* mRNA was significantly increased by IFN β in NIT-1 cells ($*p<0.05$) and in NOD islets ($***p<0.001$) (data from four and three independent experiments, respectively). Results were normalised to *Gapdh* expression and compared with a calibrator (untreated NIT-1 cells and NOD-SCID islets, respectively). Light grey bars, NIT-1 (basal); dark grey bars, NIT-1 with HuIFN β ; white bars, NOD and NOD-SCID mice; black bars, NOD RIP-HuIFN β and NOD-SCID RIP-HuIFN β transgenic mice

mice were higher than in wild-type mice by 1.9- and 2.1-fold, respectively, (data not shown).

Enlarged islets in RIP-HuIFN β mice

Since REG causes beta cell proliferation, we studied the endocrine area of the islets hyperexpressing REG. The area of the islets from NOD RIP-HuIFN β mice, with mild insulinitis, was $18,356 \pm 1,755 \mu\text{m}^2$, 33.8% larger than those of NOD wild-type mice ($13,717 \pm 1,532 \mu\text{m}^2$) ($p < 0.05$). Moreover, the area of the islets from CD-1 RIP-HuIFN β , with peri-insulinitis, was $17,231 \pm 770 \mu\text{m}^2$, 25% increased when compared with CD-1 wild-type mice ($12,686 \pm 543 \mu\text{m}^2$) ($p < 0.01$). Islets enlarged in 21% of the area ($17,315 \pm 1,354 \mu\text{m}^2$) were also found in NOD-SCID RIP-HuIFN β mice (insulinitis-free) when compared with NOD-SCID mice ($14,304 \pm 1,139 \mu\text{m}^2$) ($p < 0.01$) (Fig. 7a). Hence, we conclude that the increase of the islet area observed in transgenic mice

did not depend on the degree of insulinitis but on the presence of IFN β . Transgenic mice, on the three genetic backgrounds studied, showed a lower percentage of small islets ($< 10,000 \mu\text{m}^2$) and a higher percentage of large islets ($> 20,000 \mu\text{m}^2$) (Fig. 7b). Moreover, the distribution of the islets in categories was similar in NOD, NOD-SCID and CD-1 mice. Thus, the expression of IFN β in beta cells correlates with a higher percentage of large islets. The increase of the endocrine area may be caused by an increase in the beta cell size or in the islet cell number. No significant differences were found in the size of beta cells when comparing CD-1 transgenic mice with control mice (431 ± 16.1 vs $407 \pm 15.7 \mu\text{m}^2$). Moreover, beta cell density in the islets was the same in CD-1 RIP-HuIFN β (988.4 cells/ mm^2) as in wild-type mice (988.3 cells/ mm^2). These data support the hypothesis that islet hyperplasia in transgenic mice is caused by an increase in the number of cells per islet. However, this islet hyperplasia did not cause any metabolic dysfunction; body weight, pancreatic weight, insulinaemia, pancreatic insulin contents and i.p. glucose tolerance tests were not altered in non-diabetic transgenic mice [8].

Discussion

The main finding of this study is *Reg2* hyperexpression in the infiltrated islets from NOD RIP-HuIFN β transgenic mice, correlating with islet enlargement and premature onset of diabetes: islets overexpress *Reg2* both before and at the onset of the disease, but *Reg1* expression did not increase significantly. Insulinitis was not the only cause of this overexpression, because severely infiltrated islets from NOD mice did not hyperexpress *Reg*. The direct effect of IFN β upregulating *Reg1* and *Reg2* was demonstrated in the NOD insulinoma cell line NIT-1. *Reg2* hyperexpression associated with IFN β always correlated with a relevant increase in IL-6, both in the islets from RIP-HuIFN β transgenic mice and in NIT-1 cell line, consistent with the described regulation of REG by IL-6. Moreover, mice with accelerated IFN β -driven diabetes showed higher levels of insulin than diabetic NOD mice, as expected in islets hyperexpressing *Reg2*. However, the increase in *Reg1* and *Reg2* observed in the islets from NOD-SCID RIP-HuIFN β mice compared with NOD-SCID was not statistically significant. Interestingly, the islets from NOD RIP-HuIFN β and NOD-SCID RIP-HuIFN β transgenic mice displayed an increased area compared with wild-type mice. This islet hyperplasia did not cause a metabolic dysfunction of the beta cells.

The role of type 1 IFNs in autoimmunity has been discussed elsewhere [34]. This is the first report assessing the role of type 1 IFN in increasing the expression of REG, a diabetes autoantigen. The upregulation of *Reg2* in NOD

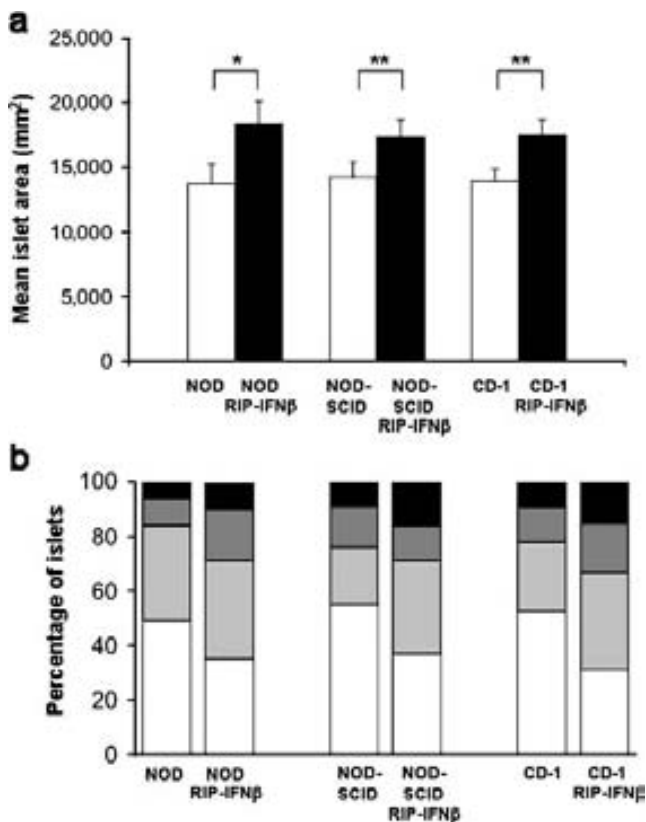


Fig. 7 Morphological studies. **a** Histogram of the mean of islet area (μm^2) in transgenic mice (black bars) and wild-type (white bars) NOD, NOD-SCID and CD-1 mice at the age of 4 weeks. A minimum of 20 islets/mouse was evaluated (three animals/condition). RIP-HuIFN β transgenic mice showed an increased islet area when compared with control ($*p < 0.05$ and $**p < 0.001$). **b** Percentage of islets classified in each of the four area (μm^2) categories. A minimum of 20 islets/mouse was evaluated (three animals/condition) in NOD, NOD-SCID and CD-1 mice (RIP-HuIFN β transgenic and control mice). White, small islets ($0\text{--}10,000 \mu\text{m}^2$); light grey, medium islets ($10,000\text{--}20,000 \mu\text{m}^2$); dark grey big islets ($20,000\text{--}30,000 \mu\text{m}^2$); black, mega islets ($>30,000 \mu\text{m}^2$)

RIP-HuIFN β transgenic mice could reflect the regeneration of beta cells during the autoimmune attack accelerated by the antiviral cytokine. Our results showed that IFN β also increases IL-6 in the beta cells. The correlation of IL-6 and *Reg2* hyperexpression observed in our model agrees with the previously reported IL-6 response elements in murine *Reg* genes [10, 14] and with the islet inflammation and hyperplasia detected in transgenic mice expressing IL-6 in the islet beta cells [35]. Since inflammation upregulates *Reg* expression, we assessed insulinitis score. We conclude that insulinitis is not the only cause of *Reg2* hyperexpression, because old NOD mice did not hyperexpress *Reg* although they exhibited strong insulinitis. Moreover, the islets from NOD-SCID RIP-HuIFN β transgenic mice (insulinitis-free) produced REG2 in the islets. Our results suggest that beta cell damage or stress is required for REG2 hyperexpression to promote cell growth or repair.

During a viral infection, IFN β modulates inflammatory and immune responses by upregulating *MHC I* and *Ii6* genes, among others [36]. The link between infections and type 1 diabetes has not been demonstrated, but infected islets themselves may produce inflammatory cytokines [37], affecting the clinical outcome of beta cell autoimmunity [38]. However, virally induced cytokines and chemokines can accelerate or prevent autoimmunity depending on the host strain, age, sex, immunological competence, time, location and level of expression. For example, another viral stimulus, the synthetic double-stranded RNA poly (I:C), inducer of IFN α and other cytokines, can either prevent or exacerbate the pathogenic effects of diabetogenic viruses, depending on the genetic background and the timing of administration [39, 40]. In our model, IFN β expression in NOD islets results in an early onset of autoimmune diabetes. Since many virus-infected or stressed cells produce IFN β , our data suggest that *Reg* upregulation may regenerate beta cells that might accelerate the autoimmune process towards beta cells, contributing to an early onset of type 1 diabetes.

Since REG causes beta cell proliferation, we determined possible changes in islet morphology in transgenic mice. Enlarged islets were found in RIP-HuIFN β transgenic mice. Mega islets have been associated with dendritic cells and macrophages and with beta cell activity [41]. Different factors may contribute to mega islet formation in RIP-HuIFN β mice: innate immunity, insulinitis and beta cell damage/activity.

A transient attempt at beta cell regeneration was observed at the early stages of insulinitis in NOD mice [41]. It has been reported that leucocytes influence endocrine cell growth [42]. The expression of *Reg* in the islets and ductal cells of prediabetic NOD mice [10], suggests that the early insulinitis or the associated cytokines (IL-6, type I IFNs) may induce regeneration, also described in diabetic transgenic mice expressing IFN γ in the islets [43] and in a cyclophospha-

mid-induced type 1 diabetes model [44]. New beta cell formation and destruction has been found in long-standing type 1 diabetes patients, thus suggesting regeneration in chronic autoimmunity [45].

A REG family member has been described recently as an autoantigen in diabetes, but unlike other autoantigens, it seems to be upregulated during the prediabetic period [10]. Preliminary results from our group suggest that the response of islet-infiltrating T cells from transgenic (RIP-HuIFN β) and wild-type (NOD) mice to REG2, is higher than the response to GAD (data not shown), thus supporting the role of REG as an autoantigen. The expression of the most well-known type 1 diabetes autoantigens is not upregulated at the beginning of the autoimmune process. Therefore, the autoimmune attack could be accelerated by the upregulation of *Reg* in the islets. After the clinical onset of type 1 diabetes, most patients enter a period of remission (honeymoon) as a consequence of diminished autoimmunity and/or of beta cell regeneration. Autoantibodies to REG have been found in diabetic patients and these autoantibodies may neutralise the proliferative effect of REG [11]. Whether *Reg* upregulation described in our model plays a key role both in regeneration and in diabetes onset remains to be determined.

In summary, the autoantigen REG overexpressed in islets from NOD RIP-HuIFN β transgenic mice correlates with enlarged islets in non-diabetic animals and with an acceleration of diabetes onset. REG could provide novel molecular targets for the prognosis and progression of type 1 diabetes, for the recurrence of autoimmunity after pancreas or islet transplantation, and for the design of immunotherapy.

Acknowledgements This work was supported by the Spanish Ministry of Health (FIS 02/0107 and 04/1686 to M. Vives-Pi). R. Planas and A. Alba were supported by fellowships from the Instituto de Salud Carlos III (FI05/00418 and BEFI 01/9065). J. Verdaguer is associate professor of the Serra-Hunter Programme from the Catalan Government, and M. Vives-Pi is a researcher supported by FIS, Spanish Ministry of Health. We thank M. Taron and L. Perez (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain) for his help with quantitative RT-PCR, and V. Nacher (Autonomous University of Barcelona, Spain) for advising in morphology studies. We are grateful to E. Tolosa (University of Tübingen, Germany) for assistance with the microdissection technique.

Duality of interest None of the authors has any conflict of interest with regard to the information contained in this manuscript.

References

1. Bach JF, Chatenoud L (2001) Tolerance to islet autoantigens in type I diabetes. *Annu Rev Immunol* 19:131–161
2. Jun HS, Yoon JW (2003) A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 19:8–31
3. Maugh TH (1975) Diabetes: epidemiology suggests a viral connection. *Science* 188:347–351
4. Banatvala JE, Bryant J, Schernthaner G et al (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
5. Foulis AK, Farquharson MA, Meager A (1987) Immunoreactive alpha interferon in insulin secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 2:1423–1427
 6. Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C et al (1994) Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile. *J Immunol* 153:1360–1377
 7. Huang X, Yuang J, Goddard A et al (1995) Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* 44:658–664
 8. Alba A, Puertas MC, Carrillo J et al (2004) IFNbeta accelerates autoimmune type diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to beta cells in non-diabetes-prone mice. *J Immunology* 173:6667–6675
 9. Anderson MS, Bluestone JA (2005) The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23:447–485
 10. Gurr W, Yavari R, Wen L et al (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
 11. Shervani NJ, Takasawa S, Uchigata Y et al (2004) Autoantibodies to REG, a beta-cell regeneration factor, in diabetic patients. *Eur J Clin Invest* 34:752–758
 12. Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S et al (1988) A novel gene activated in regenerating islets. *J Biol Chem* 263:2111–2114
 13. Zhang YW, Ding LS, Lai MD (2003) *Reg* gene family and human diseases. *World J Gastroenterol* 9:2635–2641
 14. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S et al (2005) Possible role of REG I alpha protein in ulcerative colitis and colitic cancer. *Gut* 54:1437–1444
 15. Ogawa H, Fukushima K, Naito H et al (2003) Increased expression of HIP/PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model. *Inflamm Bowel Dis* 9:162–170
 16. Terazono K, Uchiyama Y, Ide M et al (1990) Expression of Reg protein in rat regenerating islets and its co-localisation with insulin in the beta cell secretory granules. *Diabetologia* 33:250–252
 17. Okamoto H (1999) The *Reg* gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 6:254–262
 18. Watanabe T, Yonemura Y, Yonekura H et al (1994) Pancreatic beta cell replication and amelioration of surgical diabetes by Reg protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3589–3592
 19. Unno M, Nata K, Noguchi N et al (2002) Production and characterisation of Reg knockout mice. *Diabetes* 51(Suppl 3):S478–S483
 20. Gross DJ, Weiss L, Reibstein I et al (1998) Amelioration of diabetes in nonobese diabetic mice with advanced disease by linomide induced immunoregulation combined with Reg protein treatment. *Endocrinology* 139:2369–2374
 21. Qiu L, List EO, Kopchick JJ (2005) Differentially expressed proteins in the pancreas of diet induced diabetic mice. *Mol Cell Proteomics* 4:1311–1318
 22. Yoshino N, Ishihara S, Rumi MA et al (2005) Interleukin-8 regulates expression of Reg protein in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Am J Gastroenterol* 100:2157–2166
 23. Hamaguchi K, Gaskins HR, Leiter EH (1991) NIT-1, a pancreatic β -cell line established from a transgenic NOD/Lt mouse. *Diabetes* 40:842–849
 24. Dhib-Jalbut SS, Cowan EP (1993) Direct evidence that interferon-beta mediates enhanced HLA-class I expression in measles virus-infected cells. *J Immunol* 151:6248–6258
 25. Pelegrin M, Devedjian DJ, Costa C et al (1998) Evidence from transgenic mice that interferon-beta may be involved in the onset of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 20:12332–12340
 26. Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH (1992) The nonobese diabetic SCID mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3290–3294
 27. 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 non obese diabetic mice. *J Immunol* 161:3912–3918
 28. Vargas F, García-Cuyás F, Julián JF et al (2001) Engraftment of islets obtained by collagenase and liberase in diabetic rats: a comparative study. *Pancreas* 23:406–413
 29. Vives-Pi M, Somoza N, Vargas F et al (1993) Expression of glutamic acid decarboxylase (GAD) in the alpha, beta and delta cells of normal and diabetic pancreas: implications for the pathogenesis of type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 92:391–396
 30. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402–408
 31. Yonemura Y, Takashima T, Miwa K, Miyazaki I, Yamamoto H, Okamoto H (1984) Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatised rats by poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors: evidence of islet beta-cell regeneration. *Diabetes* 33:401–404
 32. Montanya E, Nacher V, Biarnes M, Soler J (2000) Linear correlation between beta cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats. *Diabetes* 49:1341–1346
 33. Brod SA, Marshall GD Jr, Henninger EM, Sriram S, Khan M, Wolinsky JS (1996) Interferon-beta 1b treatment decreases tumor necrosis factor-alpha and increases interleukin-6 production in multiple sclerosis. *Neurology* 46:1633–1638
 34. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH (2005) Type I interferons in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23:307–335
 35. Campbell IL, Hoobs MV, Dockter J et al (1994) Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Am J Pathol* 145:157–166
 36. Der SD, Zhou A, Williams BRG, Silverman RH (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15623–15628
 37. Campbell IL, Curti A, Wilson A, Harrison LC (1989) Evidence for IL6: production by and effects on the pancreatic beta cells. *J Immunol* 143:1188–1191
 38. Filippi C, von Herrath M (2005) How viral infections affect the autoimmune process leading to type 1 diabetes. *Cell Immunol* 233:125–132
 39. Serreze DW, Hamaguchi K, Leiter EH (1989) Immunostimulation circumvents diabetes in NOD/Lt mice. *J Autoimmun* 2:759–776
 40. Sobel DO, Goyal D, Ahvazi B et al (1998) Low dose poly I:C prevents diabetes in the diabetes prone BB rat. *J Autoimmun* 11:343–352
 41. Rosmalen JGM, Leenen PJM, Pelegri C, Drexhage HA, Homodelarche F (2000) Islet abnormalities associated with an early influx of dendritic cells and macrophages in NOD and NODscid mice. *Lab Invest* 80:769–777
 42. Simons PJ, Deleamarre FG, Drexhage HA (1998) Antigen presenting dendritic cells as regulators of the growth of thyrocytes: a role of interleukin-1 beta and interleukin-6. *Endocrinology* 139:3148–3156
 43. Gu D, Sarvetnik N (1993) Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN-gamma transgenic mice. *Development* 118:33–46
 44. Matos M, Park, Mathis D, Benoist C (2004) Progression to islet destruction. *Diabetes* 53:2310–2321
 45. Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC (2005) Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 48:2221–2228

Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in Type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in long-standing diabetes

R. Planas,* J. Carrillo,* A. Sanchez,^{†‡}

M. C. Ruiz de Villa,[†] F. Nuñez,[‡]

J. Verdager,[§] R. F. L. James,[†]

R. Pujol-Borrell* and M. Vives-Pi*

*Laboratory of Immunobiology for Research and Applications to Diagnosis (LIRAD), Blood and Tissue Bank, Research Institute Germans Trias i Pujol, Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Autonomous University of Barcelona, Badalona, [†]Statistics Department, University of Barcelona, [‡]Research Institute Vall d'Hebron, University Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, [§]Immunology Unit, University of Lleida and IRB Lleida, Lleida, Spain, and [†]Department of Infection, Immunity and Inflammation, University of Leicester, Leicester, UK

Accepted for publication 13 October 2009
Correspondence: Professor R. Pujol-Borrell, LIRAD, Research Institute Germans Trias i Pujol, Carretera Canyet s/n, 08916 Badalona, Spain.
E-mail: ricardo.pujol@uab.es

Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is an organ-specific autoimmune disease that results from autoimmune destruction of insulin-producing β cells in the pancreatic islets of Langerhans [1]. Due to ethical and practical problems that limit access to these tissues, current understanding of the destructive processes in the diabetic pancreas is limited to morphological and immunopathological observations made in a small number of autopsies [2–9] and biopsies [10] of T1D patients, including a previous study from our laboratory. These studies have shown β cell destruction and islet infiltration by lymphocytes, macrophages, natural killer and

Summary

Type 1 diabetes (T1D) is caused by the selective destruction of the insulin-producing β cells of the pancreas by an autoimmune response. Due to ethical and practical difficulties, the features of the destructive process are known from a small number of observations, and transcriptomic data are remarkably missing. Here we report whole genome transcript analysis validated by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT–PCR) and correlated with immunohistological observations for four T1D pancreases (collected 5 days, 9 months, 8 and 10 years after diagnosis) and for purified islets from two of them. Collectively, the expression profile of immune response and inflammatory genes confirmed the current views on the immunopathogenesis of diabetes and showed similarities with other autoimmune diseases; for example, an interferon signature was detected. The data also supported the concept that the autoimmune process is maintained and balanced partially by regeneration and regulatory pathway activation, e.g. non-classical class I human leucocyte antigen and leucocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B1 (LILRB1). Changes in gene expression in islets were confined mainly to endocrine and neural genes, some of which are T1D autoantigens. By contrast, these islets showed only a few overexpressed immune system genes, among which bioinformatic analysis pointed to chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5) and chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4) chemokine pathway activation. Remarkably, the expression of genes of innate immunity, complement, chemokines, immunoglobulin and regeneration genes was maintained or even increased in the long-standing cases. Transcriptomic data favour the view that T1D is caused by a chronic inflammatory process with a strong participation of innate immunity that progresses in spite of the regulatory and regenerative mechanisms.

Keywords: autoimmunity, human, islets, pancreas, T1D, transcriptome

dendritic cells and over-expression of a short list of immune system genes and, in some cases, of Coxsackie virus proteins [8,11]. Unfortunately, there is no information on the global changes at the molecular level that occur *in situ* in T1D patients, from studies of peripheral blood [12,13] and sera [14]. To interpret the pathology more clearly and to advance in our understanding of the processes that lead to islet destruction it would be important to have detailed information of all the changes occurring at the molecular level *in situ*.

During the last 20 years, and in part through a programme of clinical islet transplantation and sample exchange with other groups, we have collected pancreases from multi-organ

donors and from four T1D patients who died at different stages of the disease.

Here we report whole genome transcript analysis validated by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT–PCR) and correlated with immunohistological observations for these four pancreases and for purified islet preparations from two of them. This study provides an insight into the complex pattern of the immune gene expression disturbances that occur in the diabetic pancreas, in addition to confirming the predicted immunopathological mechanisms that highlight a number of natural immunity–inflammatory, immunoregulatory and regenerative pathways, some of which have received relatively little attention so far.

Materials and methods

Patients

Pancreases were obtained from four patients who died at different T1D stages. Case 1 (clinical onset) was a 19-year-old woman who died 5 days after T1D diagnosis [5], human leucocyte antigen (HLA) type HLA-A*02, *68; B*39, *49; Cw*03, *12; DRB1*04, *13; DQB1*0302, *0603; case 2 (recent onset) was a 16-year-old man who died 9 months after T1D onset, HLA type HLA-A*02, *24; B*39, *-; Cw*07, *-; DRB1*07, *08; DQB1*0202, *0402; case 3 (long-standing) was a 29-year-old man who died 8 years after T1D onset, HLA type HLA-A*01, *29; B*07, *08; Cw*07, *-; DRB1*03, *-; DQB1*0201, *-; and case 4 (longstanding) was a 26-year-old man who died 10 years after T1D onset [5], HLA type HLA-A*01, *30; B*18, *40; Cw*03, *05; DRB1*03, *04; DQB1*0201, *0302. No clinical features associated with other autoimmune diseases were present in these patients. As controls, pancreases from seven organ donors (four men and three women, age range 19–53 years, negative for islet cell antibodies) were used. The body mass index (BMI) was between 20 and 25 for all patients and controls (data are summarized in Table 1). The protocols were approved by the Ethical Committee of the University Hospital Germans Trias i Pujol, in accordance with the Declaration of Helsinki.

Pancreas processing and islet isolation

As soon as the tissue samples reached the laboratory they were divided into two portions: approximately three-quarters of each gland underwent digestion, while one-quarter was cut into small cubes (0.5 cm³) that were snap-frozen. Islets from four of the controls and from cases 1 and 4 were isolated from the fresh pancreas tails by enzymatic digestion using a standard automated method [15], selected manually under a stereoscopic microscope and snap-frozen. Samples were kept in liquid nitrogen until RNA extraction.

Sample processing and chip hybridization

RNA was obtained from each T1D sample and controls (whole pancreas and purified islets) using RNeasy Micro (Qiagen, Hilden, Germany). RNA quality (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) was optimal for microarray experiments (RNA integrity number 6.2–7.9). cDNA was synthesized with 3.5–5 mg of total RNA using the One Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA), purified (GeneChip® Sample Cleanup Module; Affymetrix), fragmented and checked to verify the integrity. Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (38 500 genes) were hybridized and scanned by an Affymetrix G3000 GeneArray Scanner and processed with Microarray Analysis Suite 5.0.

Statistical analyses for microarrays

Pre-processing. Raw expression values obtained from .CEL files were pre-processed using the robust multi-array average (RMA) method (Affymetrix) [16]. These normalized values were used for all subsequent analyses. Data were subjected to non-specific filtering to remove low signal and low variability genes. Conservative (low) thresholds were used to reduce possible false negative results. Selection of differentially expressed genes was based on a linear model analysis with empirical Bayes modification for the variance estimates, as described previously [17]. This method is similar to using a ‘*t*-test’ with an improved estimate of the variance. To account for multiple testing probability effects arising when many tests (one per gene) are performed simultaneously, *P*-values were adjusted to obtain stronger control over the false discovery rate [18]. Genes were considered to be expressed differentially based on the following criteria. Genes with a *P*-value ≤ 0.05, adjusted *P*-value ≤ 0.26 and fold change (FC) ≥ 1.75 (log₂FC ≥ 0.8) were considered up-regulated, and genes with FC ≤ -1.46 (log₂FC ≤ -0.54) were considered down-regulated. The chosen criterion was *P*-value ≤ 0.05. The ingenuity pathway analysis (IPA) (Ingenuity Systems®, Redwood City, CA, USA) was used to identify the canonical pathways from the IPA library that were most significant to the data sets.

qRT–PCR

RNA (1 µg for whole pancreas and 200 ng for purified islets) was reverse transcribed with Moloney murine leukemia virus (MMLV) (Promega, Madison, WI, USA). qRT–PCR was performed on a LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using SYBR® Green I Master mix (Roche Diagnostics) and specific primers (Invitrogen, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) (Table 2). We selected 21 genes with *P*-values < 0.05 on the basis of their levels of differential expression and biological relevance: *NMES1*, *CRP*, *REG3A*, *TLR3*, *CD44*, *HLA-E*, *CD36*, *S100A8*, *TNFSF10* (TRAIL), *IFNAR2*, *IL8*, *CXCL1*, *INS*, *PNLIP*, *ERAP2*, *PPY*, *REG4*, *LYZ*, *CXCL12*, *HSPA6* and *INSR*. Relative quantification was deter-

Table 1. Clinical data for Type 1 diabetes (T1D) patients and controls used in gene expression studies.

Subject	T1D	Age	Gender	COD	BMI	ICA	Glic	Risk alleles	Pancreas	Islets/purity
Case 1	5 days	19	Female	BE	20.9	+	648	B39 DR4-DQ8	Yes	Yes > 90%
Case 2	9 months	16	Male	BE	< 25	n.d.	285	B39	Yes	n.a.
Case 3	8 years	29	Male	BE	21.9	n.d.	146	DR3-DQ2	Yes	n.a.
Case 4	10 years	26	Male	HT	23.4	n.d.	n.a.	DR4DQ8/DR3DQ2	Yes	Yes > 90%
Control 1	Healthy	30	Female	HT	22.9	NEG	257	NEG	Yes	n.a.
Control 2	Healthy	21	Male	HT	23.1	NEG	133	DR4-DQ8	Yes	n.a.
Control 3	Healthy	20	Female	CA	20.2	NEG	271	NEG	Yes	n.a.
Control 4	Healthy	20	Female	HT	< 25	NEG	NA	n.a.	n.a.	Yes > 80%
Control 5	Healthy	19	Male	HT	23.5	NEG	299	n.a.	n.a.	Yes > 90%
Control 6	Healthy	48	Male	HT	< 25	NEG	126	n.a.	n.a.	Yes > 90%
Control 7	Healthy	53	Male	BE	24.1	NEG	NA	n.a.	n.a.	Yes > 90%

Age is given in years. COD: cause of death; HT: head trauma; BE: brain oedema; CA: cardiorespiratory arrest; n.a.: not available; n.d.: not done; NEG: negative; Glic: glycaemia in mg/dl.

mined by normalizing the expression for each gene to the *HPRT* gene following the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [21]. *HPRT* was selected as a housekeeping gene among seven candidate genes because it showed the most constant expression levels for both normal and pathological samples. All measurements were performed in triplicate in three separate runs and expressed as mean \pm standard error of the mean (s.e.m.). Statistical analysis used a *t*-test for pancreas samples and a one-sample *t*-test for islet samples.

Immunohistological analysis

Frozen sections were evaluated using a double immunofluorescence (IFL) technique. Sections (5 mm) were first

incubated with primary monoclonal antibodies (mAb): anti-CD44 (hCD44H; R&D Systems, Abingdon, UK), anti-HLA-E (clone 3D12; Dr D. Geraghty, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA), anti-C-reactive protein (CRP) and anti-REG3A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-CD68 (Dako, Glostrup, Denmark), anti-CD36 and anti-CD209 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-CD3 and anti-CD4 (Professor P. Beverley, London, UK), anti-CD45, anti-CD4 and anti-CD19 (Dr R. Vilella, Hospital Clinic, Barcelona, Spain) or guinea pig anti-insulin (ICN, Aurora, OH, USA). Primary antibodies were followed by either Alexa 488 goat anti-mouse immunoglobulin (Ig)G1 or IgG2a, Alexa 488 rabbit anti-goat Ig, Alexa 546 goat anti-mouse IgG2b (Molecular

Table 2. List of primers used for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.

Gene	Sense	Anti-sense	Amplimer length
<i>NMES1</i>	5'-ATCCCTTGGTGGTTCAT-3'	5'-TTTTTTTTTCGATCAAGGATCA-3'	101
<i>CRP</i>	5'-TCCTATGTATCCCTCAAAGCA-3'	5'-GGTGGCATAACGAGAAAATACT-3'	117
<i>REG3A</i>	5'-CCTGTCGAGAAGCACAGC-3'	5'-GGGAGGAAGAAACAGAAGAAA-3'	232
<i>TLR3</i>	5'-ACACCATCTCAAACCTGGA-3'	5'-AAACACCCTGGAGAAAACCT-3'	397
<i>CD44</i>	5'-TGAGCATCGGATTTGAGAC-3'	5'-GTGTCATACTGGGAGGTGT-3'	139
<i>HLA-E</i>	5'-TCTCCGAGCAAAGTCAA-3'	5'-GAGATGGGGTGGTGAGTC-3'	160
<i>TRAIL</i>	5'-GTCTCTGTGTGGCTGTAA-3'	5'-CTCAAATCATCTTTCTAACG-3'	201
<i>IFNAR2</i>	5'-AACACGAACTACTGTGTATCT-3'	5'-GTGTCACTATGGTGCTTG-3'	184
<i>IL-8</i>	5'-TACTCCAAACCTTTCCACC-3'	5'-AACCTACAACAGACCCAC-3'	288
<i>CXCL1</i>	5'-GTTAATATTTCTGAGGAGCCTGC-3'	5'-AAACAGTTACAAAACAGATGTGC-3'	128
<i>INS</i> [†]	5'-AAGCGTGGCATTGTGGAAC-3'	5'-CAAGGGCTTTATTCCATCTCTC-3'	138
<i>PNLIP</i>	5'-GAGCAGTAGCAGAAAAGAAGT-3'	5'-TTAGTATATAGGAGGAAGCGGG-3'	145
<i>CD36</i>	5'-GACAGTTTGGATCTTTGATG-3'	5'-CTTTGCTTAACTTGAATGTTG-3'	76
<i>ERAP2</i>	5'-TCTACTATCCACTCTCCAACT-3'	5'-GTCTCCCTATATGTAATGAGG-3'	126
<i>S100A8</i>	5'-GATGACCTGAAGAAATGCT-3'	5'-ATATCCAACCTTTGAACCAG-3'	86
<i>PPY</i>	5'-TGCCAGGGAGCCCACTG-3'	5'-CTAGGCCCTGGTCAGCATGTTGA-3'	114
<i>HSPA6</i>	5'-GAGATGAACCTTCCCTCCAAAGC-3'	5'-TTGAAGCAGAAAGAGGATGAACCG-3'	98
<i>LYZ</i>	5'-GGGCTTGTCCTCTTTCTGTT-3'	5'-GTTGTAACCACTCTCCCATTTG-3'	150
<i>CXCL12</i>	5'-AACGTCAAGCATCTCAAAT-3'	5'-CTTGTCTGTTGTTGTTCTTCA-3'	82
<i>REG4</i>	5'-GGGTGGGAACAAGCACTG-3'	5'-GTCTCTAAGCCTAAAAAGCC-3'	260
<i>INSR</i>	5'-GGAACACAGCGTGCAGAT-3'	5'-GAAGAAGCGTAAAGCGGTC-3'	229
<i>HPRT</i> [‡]	5'-TGACTACTGGCAAACAATGCA-3'	5'-GGTCTTTTCCACCAGCAAGCT-3'	94

[†]INS and [‡]HPRT primers are described in Sabater L *et al.* [19] and Vandesompele J *et al.* [20].

Table 3. Insulinitis characteristics in the islets from four Type 1 diabetes (T1D) patients.

Case	CD3 ⁺		CD4 ⁺		CD8 ⁺		CD19 ⁺		CD68 ⁺		DC-SIGN ⁺	
	Positive islets	Cells/islet, mean ± s.e.m.	Positive islets	Cells/islet, mean ± s.e.m.	Positive islets	Cells/islet, mean ± s.e.m.	Positive islets	Cells/islet, mean ± s.e.m.	Positive islets	Cells/islet, mean ± s.e.m.	Positive islets	Cells/islet, mean ± s.e.m.
1	100%	12.17 ± 2.89	69%	1.69 ± 0.51	93%	9.28 ± 2.81	71%	1.66 ± 0.35	100%	6.85 ± 1.16	24%	0.41 ± 0.19
2	91%	8.06 ± 0.89	74%	2.95 ± 0.95	95%	4.93 ± 0.73	79%	2.88 ± 0.47	98%	4.66 ± 0.55	27%	0.39 ± 0.10
3	81%	2.09 ± 0.19	57%	1.31 ± 0.27	91%	2.04 ± 0.27	80%	2.47 ± 0.32	82%	3.06 ± 0.48	28%	0.38 ± 0.07
4	91%	4.09 ± 0.93	28%	0.64 ± 0.16	63%	1.44 ± 0.31	76%	1.68 ± 0.25	100%	4.11 ± 0.99	67%	1.00 ± 0.26

s.e.m.: Standard error of the mean.

Probes, Leiden, the Netherlands) or by tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) goat anti-guinea pig (ICN). Second staining was performed using a mAb either to glucagon Glu001 (Dr P. Jorgensen, Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Denmark) or anti-glutamic acid decarboxylase (GAD) (GAD6; Hybridoma Bank, Baltimore, MD, USA) and either TRITC goat anti-mouse IgG1 or IgG2a, respectively (SBA, Birmingham, AL, USA). The preparations were examined in a fluorescence microscope and analysed using software Openlab version 2.0 (Improvision, Coventry, UK). To phenotype the leucocytes that infiltrated the islets in the four diabetic cases, sections from five different areas from two to three different tissue blocks were stained. The staining for CD45 served as the indicator of the number of islets with insulinitis. Peri-insulinitis or insulinitis were considered when lymphoid cells infiltrate the pancreas but remain outside the islets or infiltrate the islets, respectively. The numbers and percentages of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD68⁺ and CD209⁻DC-SIGN⁻ cells were counted when at the periphery or inside the islet. Between 50 and 100 islets per case were examined and all the islets (with or without infiltrating leucocytes) were scored. Analysis of variance used Tukey's multiple comparisons test, with *P*-values < 0.05 were considered significant.

Results

Immunohistological analysis of insulinitis

Most of the islets (91–100%) in the pancreas of the four cases showed mild insulinitis or peri-insulinitis that was less intense but present even in cases 3 and 4 (Table 3). Phenotypes among the infiltrating cells followed the hierarchy CD3⁺CD8⁺ >> CD68 ≥ CD19 ≥ CD3⁺CD4⁺ > CD209⁺. Case

1 insulinitis showed a significantly higher number of CD3⁺ cells when compared to case 2 (*P* < 0.05) and to cases 3 and 4 (*P* < 0.001 for both) and of CD8⁺ cells in case 1 *versus* case 4 (*P* < 0.05). By contrast, the number of CD4⁺ and B cells, macrophages and dendritic cells was maintained overall. Cases 1 and 4 have already been partially characterized and reported [5]. These immunopathological data confirm that the four cases had typical T1D and provide the framework for the interpretation of the transcriptomic analysis.

Transcriptomic profile of diabetic pancreas and purified islet cells

Four cRNA preparations from different blocks from each of the diabetic pancreases, and one from each the three control pancreases were hybridized to Affymetrix arrays (U133 Plus version 2.0). cRNA from purified islet preparations corresponding to cases 1 and 4, and from three control islet preparations were also hybridized. Following recommended procedures for the analysis of small number of samples [22], the average gene expression level of three blocks from each diabetic pancreas was compared to the average of the three control pancreases and cases 1 and 4 islet gene expression levels were compared to the average of the control islet preparations.

The number of differentially expressed genes, both up- and down-regulated, is given in Table 4. A total of 635–1444 differentially expressed genes were detected in the T1D pancreases, 149 shared in the four cases. Among these, 44 (29%) genes fell into the category of immune system and five (3.4%) into endocrine system. Approximately 900 differentially expressed genes were detected in T1D islet preparations, of which 423 were shared in the two cases. Among these, only 20 (4.7%) were classified as immune system while

Table 4. Number (percentage) of differentially expressed genes in the pancreas and islets of Type 1 diabetes (T1D) patients.

	Pancreas					Purified islets			Pancreas and islets
	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Shared	Case 1	Case 4	Shared	Shared
Differentially expressed	851	1058	1444	635	149	902	975	423	4
Up-regulated	779 (92%)	1003 (95%)	1157 (80%)	613 (97%)	146	322 (36%)	178 (18%)	65	2
Down-regulated	72 (8%)	55 (5%)	287 (20%)	22 (3%)	3	580 (64%)	797 (82%)	358	2

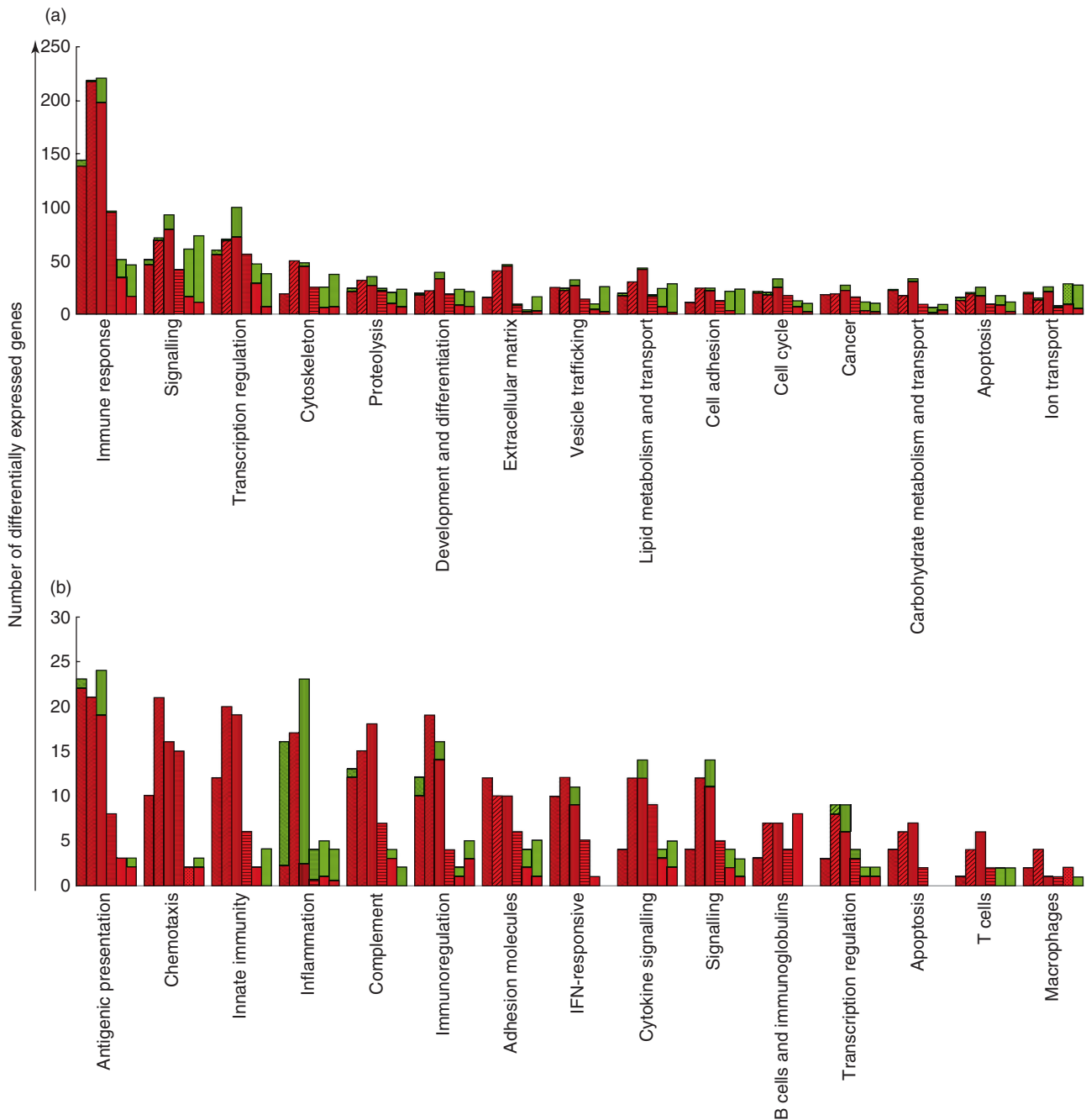


Fig. 1. Distributions of differentially expressed genes in the Type 1 diabetes (T1D) pancreas and islets by functional categories. The numbers of differentially expressed genes in each category for each sample are shown. Only the 15 most represented categories are given. Each stacked bar corresponds to a different sample and is divided into up-regulated genes (red) and down-regulated genes (green). From left to right: pancreas case 1, pancreas case 2, pancreas case 3, pancreas case 4, islets case 1, islets case 4. (a) Up- and down-regulated genes in general categories and (b) up- and down-regulated genes of immune response subcategory.

66 (15.6%) were related to endocrine function (Fig. 1). Raw data are available at the ArrayExpress repository, European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>, ArrayExpress accession ID: E-MEXP-1140).

Collectively, these results show a divergent pattern in the changes of gene expression in pancreas and islets; while in

the former most changes are increases in immune system genes, in the islets the predominant change is a reduction in the expression of endocrine and neural function genes. This divergence is also qualitative, as few of the differentially expressed genes are shared between pancreases and islets.

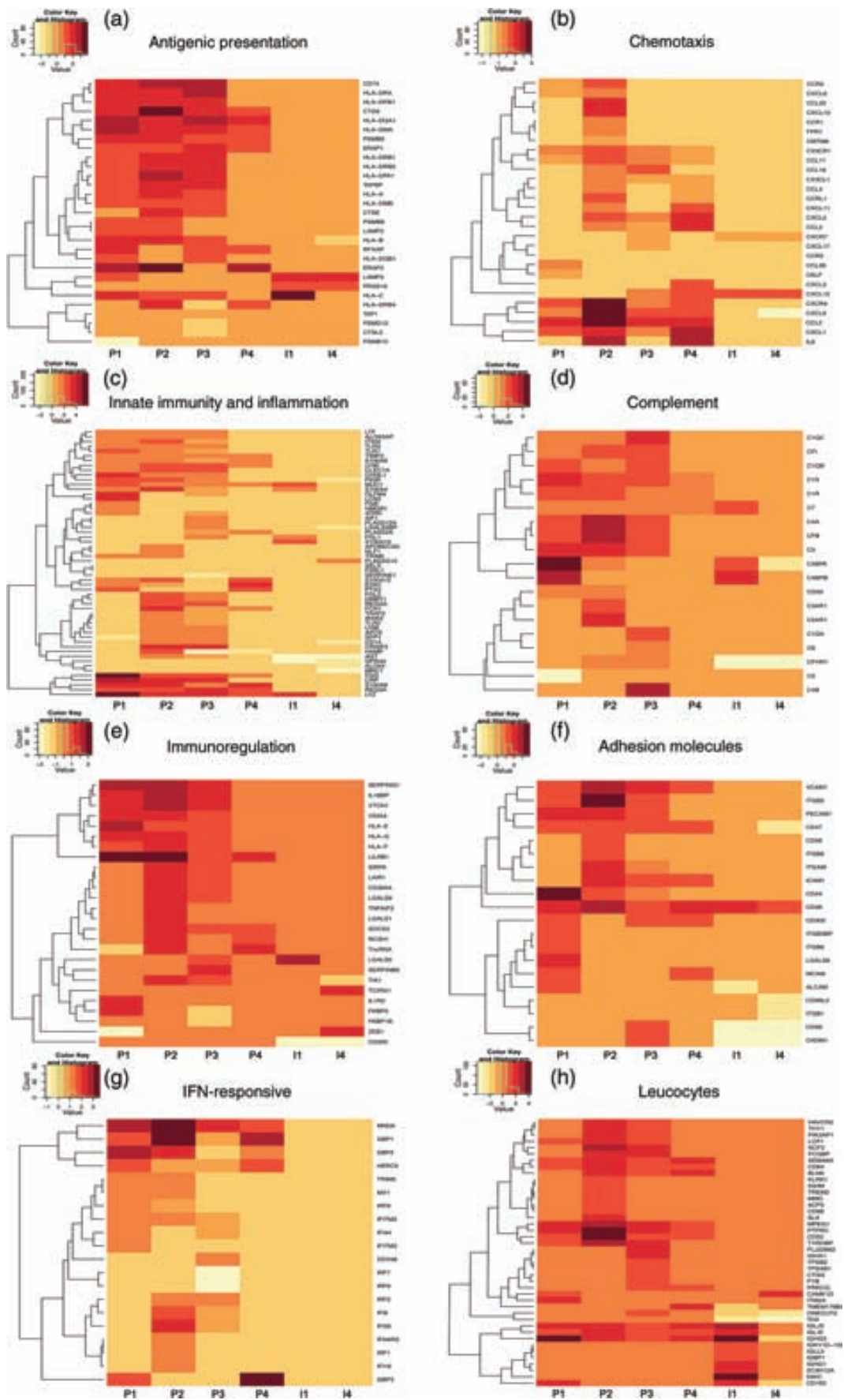


Fig. 2. Heatmaps of gene expression profiles of the immune system in pancreas and purified islets from Type 1 diabetes (T1D) patients. Rows are for differentially expressed genes and columns are for pancreases and purified islets from T1D patients. Data were transformed to \log_2 ratios relative to the mean of the normal controls and subjected to hierarchical clustering. The colour gradient key reflects relative expression on a \log_2 scale. The most over-represented immune response subcategories are antigen presentation (a), chemotaxis (b), innate immunity and inflammation (c), complement (d), immunoregulation (e), adhesion molecules (f), interferon responsive (g) and leucocytes (h). P1, pancreas from case 1; P2, pancreas from case 2; P3, pancreas from case 3; P4, pancreas from case 4; I1, islets from case 1; I4, islets from case 4.

Analysis of differentially expressed genes in T1D pancreases and islets

The genome localization of the genes in the top rank of the over- and under-expressed genes were included in two genetic regions linked more strongly to T1D and known as insulin-dependent diabetes class 1 (IDDM1) (HLA) and IDDM2 [insulin (INS)]. However, no other significant relationship between differentially expressed genes and defined IDDM predisposing loci were found consistently in the four cases.

The category that contained the largest number of differential expressed genes in the diabetic pancreas versus controls was immune response [between 15% and 21% while 6% in the gene ontology (GO) biological process immune system]. GO categories related to immune system were enriched in T1D pancreases, e.g. GO:0006955, GO:0006959, GO:0006935 and GO:0006954 ($P < 0.01$). Within it, the most over-represented subcategories were: (i) antigenic presentation; (ii) chemotaxis; (iii) innate immunity and inflammation; (iv) complement; (v) immunoregulation; (vi) adhesion molecules; (vii) interferon (IFN) responsive; and (viii) leucocyte (Fig. 1b). The heatmap analysis for each of them is represented in Fig. 2a–h.

Changes in gene expression affected 19 of the 47 genes included in the Type 1 diabetes pathway of the Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genome (<http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04940.html>), thus supporting the specificity of the changes observed.

The ingenuity pathway analysis (IPA) identified 28 different canonical pathways among the 'top 10' pathways for each pancreas (Table 5). Antigenic presentation, allograft rejection, hepatic fibrosis, complement system, acute phase response signalling and autoimmune thyroid disease signalling were associated significantly in most cases. Altered pathways in purified islets from cases 1 and 4 were related to nervous system, signalling and endocrine functions.

Total pancreas from T1D patients. Changes were analysed in order of magnitude, as they appear in Figs 2 and 3. Immune system differentially expressed genes are shown in Fig. 2a–h and Table 7 as follows.

(a) Genes of antigen processing and presentation of both the endogenous and exogenous antigen processing pathways encoded within the HLA region (HLA-A, B-C, HLA-E, -F, -G and HLA-DR, -DP, -DQ, -DM and LMP2 and 7) and outside it [low molecular weight polypeptide proteasome subunit

(LMP10), invariant chain-CD74 and cathepsin S] constituted the more over-expressed and over-represented of all these subcategories (Fig. 2a). Comparison with the immunostaining of the pancreas indicated that the changes for HLA class I were due to both modulation in parenchymal cells and leucocytic infiltration, while for HLA class II infiltration was the main cause.

(b) Chemotaxis genes were also over-expressed in the four cases. Remarkably, case 2, collected 9 months after diagnosis, showed the highest levels. Two patterns partially overlap, neutrophil attracting chemokines *CXCL1*, *CXCL6* and *IL8* (*CXCL8*) and monocyte and activated T lymphocytes attracting chemokines, *CCL2*, *CCL3* and *CCL4*. This pattern does not fit completely with the type of infiltration seen by immunohistology. Angiogenic CXCL chemokines may explain the capillary enlargement and the increase in CD36 expression (Fig. 2b).

(c) Transcripts of inflammatory response, anti-microbial defence genes and acute phase proteins were also found increased in the four cases. The over-expression of pattern recognition receptors (PRR) i.e. *TLR1*, *TLR2* and *TLR3*, *CLEC7A* (DECT1), scavenger receptor (*CD36*) and ficolin (*FCN1*) and of molecules belonging to the Toll-like receptor/interleukin-1 (TLR/IL-1) signalling pathway, e.g. *CD14*, *Ly86* (MD-1), *Ly96* (MD-2) and *IRAK2*, may explain the over-expression of message corresponding to acute phase reactants, e.g. *CRP*, lactoferrin (*LTF*), fibrinogen (*FGG*), pentraxin 3 (*PTX3*) the local inflammatory and anti-bacterial response genes, i.e. arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein (*ALOX5PA*), *MUC1* and *REG* (regenerating gene). Some changes may reflect the infiltration by cells of the monocyte/macrophage lineage, e.g. lysozyme *LYZ* and calprotectin (*S100A8/9*), rather than the activation of transcription (Fig. 2c).

(d) Twelve of the 30+ genes of the complement system were found increased in T1D pancreases. Of interest, effector and regulatory/inhibitor molecules were represented almost equally. This may reflect infiltration by activated macrophages and dendritic cells that are the main producers of complement factors and their regulators outside the liver [23] (Fig. 2d).

(e) Immunoregulatory over-expressed genes included a remarkable variety of ligands/receptor pairs capable of starting inhibitory pathways, i.e. HLA class I (classical and, more remarkably, non-classical)-*LILRB1*, B7 family members *VSIG4*- and B7-H4 (*VTCN*)-ligand(s) still uncertain, collagen-*LAIR1* and *CD47-SIRP*. There was also an increase

Table 5. Top 10 canonical pathways identified by ingenuity pathway analysis (IPA) for each case (pancreas and islets).

Sample	Top 10 IPA canonical pathways (P-value)
Pancreas case 1	Antigen presentation pathway (6.31E-14)
	Complement system (3.98E-12)
	Allograft rejection signalling (1.41E-06)
	Autoimmune thyroid disease signalling (2.57E-06)
	Acute phase response signalling (7.41E-06)
	Graft-versus-host disease signalling (7.41E-06)
	Glutathione metabolism (3.98E-05)
	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (0.0001)
	Systemic lupus erythematosus signalling (0.0003)
	Coagulation system (0.0004)
Pancreas case 2	Antigen presentation pathway (2.00E-15)
	Complement system (3.98E-12)
	Hepatic fibrosis/hepatic stellate cell activation (3.16E-11)
	Dendritic cell maturation (5.89E-08)
	Acute phase response signalling (8.32E-08)
	Type I diabetes mellitus signalling (3.72E-06)
	Caveolar-mediated endocytosis signalling (4.79E-06)
	Allograft rejection signalling (7.41E-06)
	Autoimmune thyroid disease signalling (1.32E-05)
	NF- κ B signalling (1.55E-05)
Pancreas case 3	Complement system (1.26E-12)
	Antigen presentation pathway (6.31E-12)
	Hepatic fibrosis/hepatic stellate cell activation (1.10E-07)
	Acute phase response signalling (2.45E-05)
	Leucocyte extravasation signalling (3.16E-05)
	Role of NFAT in regulation of the immune response (7.41E-05)
	Allograft rejection signalling (8.51E-05)
	Dendritic cell maturation (0.0001)
	Autoimmune thyroid disease signalling (0.0001)
	NRF2-mediated oxidative stress response (0.0002)
Pancreas case 4	Hepatic fibrosis/hepatic stellate cell activation (5.25E-05)
	Glucocorticoid receptor signalling (0.0006)
	MIF regulation of innate immunity (0.0007)
	Acute phase response signalling (0.0008)
	Chemokine signalling (0.0008)
	p38 MAPK signalling (0.0011)
	CCR5 signalling in macrophages (0.0017)
	Growth hormone signalling (0.0023)
	IL-17 signalling (0.0038)
	HMGB1 signalling (0.0044)
Islets case 1	Cardiac β -adrenergic signalling (6.03E-06)
	Maturity onset diabetes of young (MODY) signalling (7.41E-05)
	NRF2-mediated oxidative stress response (0.0004)
	cAMP-mediated signalling (0.0004)
	CCR5 signalling in macrophages (0.0008)
	CXCR4 signalling (0.0011)
	Relaxin signalling (0.0012)
	Corticotrophin releasing hormone signalling (0.0013)
	G protein signalling mediated by tubby (0.0013)
	α -adrenergic signalling (0.0029)
Islets case 4	Cardiac β -adrenergic signalling (1.07E-06)
	Axonal guidance signalling (3.89E-06)
	cAMP-mediated signalling (3.98E-05)
	MODY signalling (0.0001)
	Cellular effects of sildenafil (0.0002)
	Synaptic long-term potentiation (0.0002)
	Melatonin signalling (0.0002)
	G-protein coupled receptor signalling (0.0002)
	CREB signalling in neurones (0.0003)
	Calcium signalling (0.0003)

cAMP: cyclic adenosine-5'-monophosphate; CCR5: chemokine (C-C motif) receptor 5; CXCR4: chemokine (CXC motif) receptor 4; CREB: cAMP responsive element binding protein; HMGB1: high mobility group box 1; IL: interleukin; MAPK: mitogen activated protein kinase; MIF: macrophage migration inhibitory factor; NFAT: nuclear factor of activated T cells; NF κ B: nuclear factor kappa B; NRF2: nuclear factor-like 2.

of transcripts corresponding to molecules that counteract activation of the IL-1/IL-18 pathway, such as *IL1R2* and *IL18BP*, and of serpins, modulators of the cytotoxic and proteolytic activity of phagocytes and cytotoxic T cells [24]. The increase of transforming growth factor (TGF)- β 2 and of collagen is probably linked to repair [25] (Fig. 2e).

(f) The expression of adhesion molecules *VCAM1*, *CD36* and *CD47* was increased consistently in the four T1D pancreases.

(g) Thirty-five per cent (16 of 46) of interferon responsive genes were over-expressed in the two of the four cases, but analysis of the pattern could not discriminate between the type I and IL/IFN pathways (Pathvision 1.1 and Keg Type I and IL/IFN pathways) (Fig. 2f).

(h) The changes in expression in the subcategory of leucocyte-specific genes were reflective of the insulinitis present in the four glands but also of the scattered leucocytes seen in the exocrine areas of the four cases (and not in the controls). By number and intensity, the most up-regulated genes corresponded to B cells (Ig) followed by macrophage and dendritic cells. Few T cell signalling and activation – a few of them shared with NK cells – genes were over-expressed (Fig. 2h).

Of the T1D autoantigens, the only clear change in the total pancreas was a marked reduction of insulin message, but transcripts for the other islet hormone genes showed a large case-by-case variability (Fig. 3a and Table 6). Finally, eight exocrine function genes [amylase 1A (*AMY1A*), elastases, aquaporin (*AQP12A*) and zymogen granule protein (*ZG16*)] were diminished in case 1, but in case 2 only two genes were down-regulated: *ZG16* and *GP2* (Table 6).

Islets from T1D patients. Changes in gene expression in cases 1 and 4 islets were confined mainly to endocrine and neural genes, some of which are T1D autoantigens, i.e. insulin, GAD65 (*GAD2*), I-A2 (*PTPRN*), I-A2B (*PTPRN2*), IGRP (*G6PC2*) and ZnT8 (*SLC30A8*). Insulin secretion and endocrine transcription genes that are also highly β cell-specific were reduced markedly. Interestingly, nervous system gene transcripts, mainly neuronal-specific, were as reduced as β cell ones (Fig. 3a,b and Table 6).

By contrast, these islets showed only a few over-expressed immune system genes that were detected almost exclusively in case 1. The highest increases corresponded to lysozyme, complement, IL-1R1 and immunoglobulins, and they most probably reflect infiltration by macrophages, B and T lymphocytes (Fig. 2 and Table 7). Interestingly, Ingenuity software analysis pointed to chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5) and chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4) chemokine pathway activation (Table 5).

Differentially expressed genes reflected in situ damage and regeneration. Oxidative stress genes over-expressed were metallothioneins, such as *MTIM* (in the four cases and in purified islets) and *SOD2*, ceruloplasmin and thioredoxin

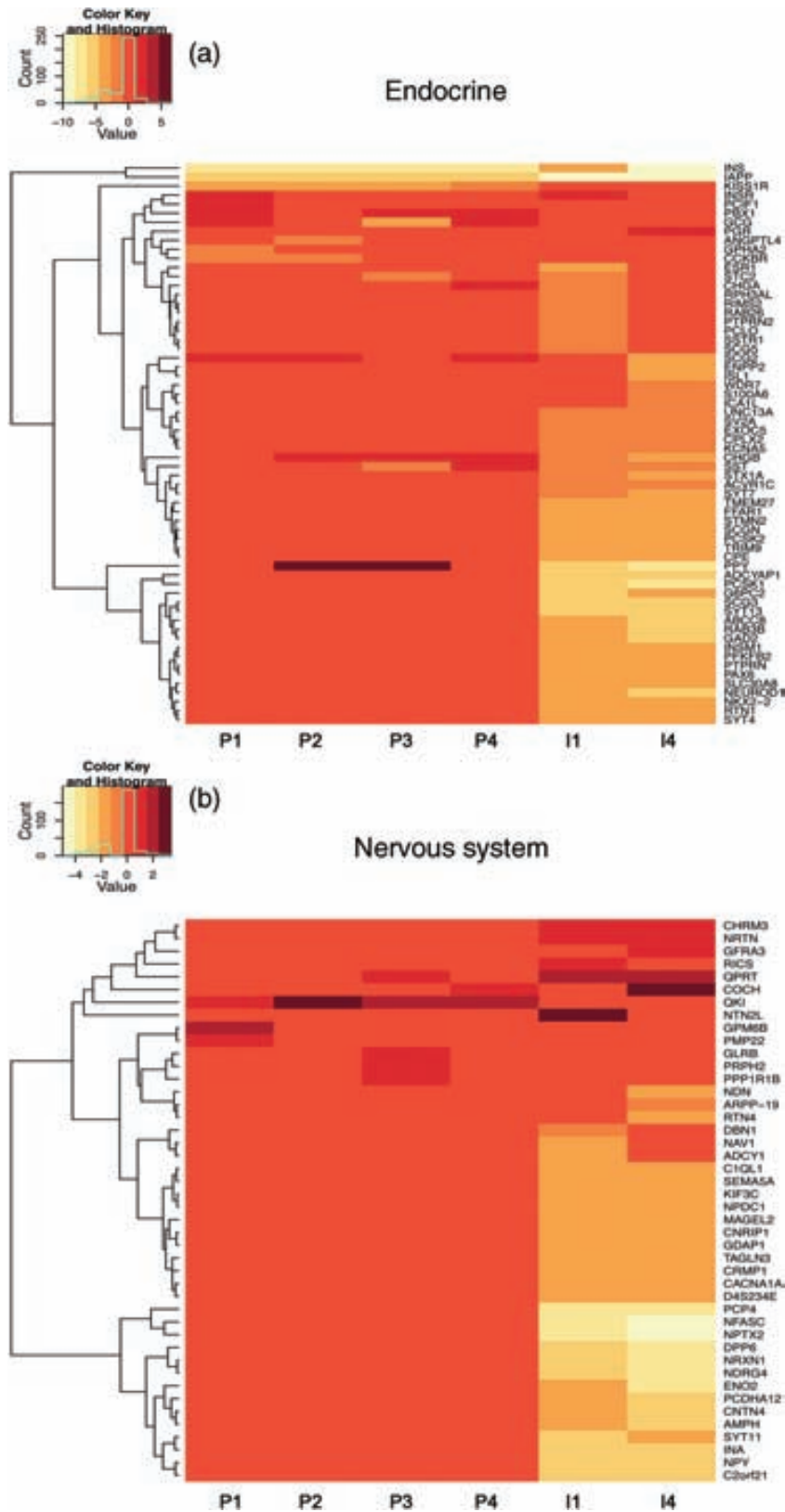


Fig. 3. Heatmaps of islet (a) and nervous system (b) gene expression profiles in pancreas and purified islets from Type 1 diabetes (T1D) patients. Rows are for differentially expressed genes and columns are for pancreas and purified islets from T1D patients. Data were transformed to \log_2 ratios relative to the mean of the normal controls and subjected to hierarchical clustering. The colour gradient key reflects relative expression on a \log_2 scale. P1, pancreas from case 1; P2, pancreas from case 2; P3, pancreas from case 3; P4, pancreas from case 4; I1, islets from case 1; I4, islets from case 4.

Table 6. Differentially expressed genes related to islet, exocrine and nervous system function in the pancreas and islets of Type 1 diabetes (T1D) patients.

Function	Locus ID	Symbol	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			pancreas	pancreas	pancreas	pancreas	islets	islets
			Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 1	Case 4
Autoantigens	2 562	<i>GAD2</i>	–	–	–	–	–4.13	–4.58
	57 818	<i>G6PC2</i>	–	–	–	–	–5.10	–4.34
	130 026	<i>ICA1L</i>	–	–	–	–	–	–2.02
	3 630	<i>INS</i>	–6.57	–6.68	–7.38	–7.38	–2.96	–9.05
	5 798	<i>PTPRN</i>	–	–	–	–	–3.53	–4.46
	5 799	<i>PTPRN2</i>	–	–	–	–	–1.88	–
	169 026	<i>SLC30A8</i>	–	–	–	–	–3.09	–4.48
Hormones/receptors	116	<i>ADCYAP1</i>	–	–	–	–	–5.63	–5.93
	51 129	<i>ANGPTL4</i>	–	–1.59	–	–	–	–
	887	<i>CCKBR</i>	–1.94	–1.44	–	–	–	–
	1 113	<i>CHGA</i>	–	–	–	1.01	–1.79	–
	1 114	<i>CHGB</i>	–	2.21	2.11	1.72	–2.28	–3.26
	2 099	<i>ESR1</i>	–	–	–	–	–3.43	–
	2 641	<i>GCG</i>	1.15	–	–2.92	1.91	–	–
	170 589	<i>GPHA2</i>	–1.54	–	–	–	–	–
	3 375	<i>IAPP</i>	–5.84	–5.40	–5.68	–5.72	–8.95	–10.01
	3 643	<i>INSR</i>	1.63	–	–	–	2.01	–
	84 634	<i>KISS1R</i>	–3.31	–3.05	–2.95	–2.68	–	–
	5 241	<i>PGR</i>	–	–	–	–	–	2.35
	5 539	<i>PPY</i>	–	5.35	6.47	–	–4.63	–6.87
	7 857	<i>SCG2</i>	1.08	1.41	–	1.46	–	–4.07
	6 447	<i>SCG5</i>	–	–	–	–	–2.38	–
	6 750	<i>SST</i>	–	–	–1.33	1.55	–2.41	–2.29
	6 751	<i>SSTR1</i>	–	–	–	–	–2.31	–
8 614	<i>STC2</i>	–	–	–1.09	–	–2.63	–	
Insulin secretion	3 741	<i>KCNA5</i>	–	–	–	–	–1.77	–2.24
	27 445	<i>PCLO</i>	–	–	–	–	–2.11	–
	130 399	<i>ACVR1C</i>	–	–	–	–	–2.44	–2.40
	5 126	<i>PCSK2</i>	–	–	–	–	–2.98	–3.56
	10 590	<i>SCGN</i>	–	–	–	–	–3.08	–3.32
	57 393	<i>TMEM27</i>	–	–	–	–	–3.20	–2.93
	1 363	<i>CPE</i>	–	–	–	–	–3.24	–3.71
	2 864	<i>FFAR1</i>	–	–	–	–	–3.64	–3.52
	5 208	<i>PFKFB2</i>	–	–	–	–	–3.77	–4.02
	6 833	<i>ABCC8</i>	–	–	–	–	–3.77	–5.23
	5 122	<i>PCSK1</i>	–	–	–	–	–5.60	–7.91
	5 168	<i>ENPP2</i>	–	–	–	–	–	–3.11
	6 277	<i>S100A6</i>	–	–	–	–	–	–1.65
	Endocrine transcription factors	3 642	<i>INSM1</i>	–	–	–	–	–3.62
3 760		<i>ISL1</i>	–	–	–	–	–	–3.47
4 760		<i>NEUROD1</i>	–	–	–	–	–2.95	–4.78
4 821		<i>NKX2-2</i>	–	–	–	–	–2.73	–4.23
5 080		<i>PAX6</i>	–	–	–	–	–3.58	–4.44
5 087		<i>PBX1</i>	1.01	–	1.37	2.40	–	–
63 935	<i>PCIF1</i>	1.95	–	–	–	–	–	
Exocrine genes	276	<i>AMY1A</i>	–2.34	–	–	–	–2.05	–
	375 318	<i>AQP12A</i>	–1.17	–	–	–	–	–
	5 407	<i>PNLIPRP1</i>	–1.29	–	0.78	–	–	2.58
	123 887	<i>ZG16</i>	–1.77	–0.92	–	–	–	–
	3 816	<i>KLK1</i>	–1.20	–	–	–	–	1.13
	342 898	<i>SYCN</i>	–2.55	–	–	–	–	–
	51 032	<i>ELA2B</i>	–4.00	–	–	–	–2.38	–
	1 990	<i>ELA1</i>	–1.78	–	–0.56	–	–	–
2 813	<i>GP2</i>	–	–1.79	–	–	–	–	
Nervous system	107	<i>ADCY1</i>	–	–	–	–	–1.64	–
	273	<i>AMPH</i>	–	–	–	–	–1.84	–2.60
	10 776	<i>ARPP-19</i>	–	–	–	–	–	–1.18
	10 882	<i>C1QL1</i>	–	–	–	–	–1.37	–1.34
	285 175	<i>C2orf21</i>	–	–	–	–	–2.78	–2.81
	773	<i>CACNA1A</i>	–	–	–	–	–1.82	–1.55
	1 131	<i>CHRM3</i>	–	–	–	–	1.22	1.50
	25 927	<i>CNRIP1</i>	–	–	–	–	–1.28	–1.71

Table 6. Continued

Function	Locus ID	Symbol	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			pancreas	pancreas	pancreas	pancreas	islets	islets
			Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 1	Case 4
	152 330	<i>CNTN4</i>	-	-	-	-	-1.69	-2.57
	1 690	<i>COCH</i>	-	-	-	-1.35	-	3.05
	1 400	<i>CRMP1</i>	-	-	-	-	-1.62	-1.67
	27 065	<i>D4S234E</i>	-	-	-	-	-1.95	-1.65
	1 627	<i>DBN1</i>	-	-	-	-	-1.14	-
	1 804	<i>DPP6</i>	-	-	-	-	-2.24	-3.77
	2 026	<i>ENO2</i>	-	-	-	-	-1.91	-3.22
	54 332	<i>GDAP1</i>	-	-	-	-	-1.37	-1.78
	2 676	<i>GFRA3</i>	-	-	-	-	-	1.35
	2 743	<i>GLRB</i>	-	-	1.36	-	-	-
	2 824	<i>GPM6B</i>	1.60	-	-	-	-	-
	9 118	<i>INA</i>	-	-	-	-	-2.46	-2.27
	3 797	<i>KIF3C</i>	-	-	-	-	-1.66	-1.30
	54 551	<i>MAGEL2</i>	-	-	-	-	-1.57	-2.11
	89 796	<i>NAVI</i>	-	-	-	-	-1.49	-
	4 692	<i>NDN</i>	-	-	-	-	-	-1.42
	65 009	<i>NDRG4</i>	-	-	-	-	-2.64	-3.42
	23 114	<i>NFASC</i>	-	-	-	-	-3.17	-4.25
	56 654	<i>NPDC1</i>	-	-	-	-	-1.62	-1.36
	4 885	<i>NPTX2</i>	-	-	-	-	-3.36	-4.98
	4 852	<i>NPY</i>	-	-	-	-	-2.62	-2.87
	4 902	<i>NRTN</i>	-	-	-	-	1.21	1.33
	9 378	<i>NRXN1</i>	-	-	-	-	-2.62	-3.35
	4 917	<i>NTN2L</i>	-	-	-	-	3.38	-
	56 137	<i>PCDHA12</i>	-	-	-	-	-2.07	-2.49
	5 121	<i>PCP4</i>	-	-	-	-	-3.82	-3.60
	5 376	<i>PMP22</i>	1.50	-	-	-	-	-
	84 152	<i>PPP1R1B</i>	-	-	0.70	-	-	-
	5 961	<i>PRPH2</i>	-	-	1.03	-	-	-
	9 444	<i>QKI</i>	1.35	2.56	1.60	1.58	-	-
	23 475	<i>QPRT</i>	-	-	0.81	-	2.04	1.75
	9 743	<i>RICS</i>	-	-	-	-	1.18	-
	57 142	<i>RTN4</i>	-	-	-	-	-	-1.28
	9 037	<i>SEMA5A</i>	-	-	-	-	-1.41	-1.44
	23 208	<i>SYT11</i>	-	-	-	-	-2.43	-2.07
	29 114	<i>TAGLN3</i>	-	-	-	-	-1.88	-1.88
Exocytosis	9 501	<i>RPH3AL</i>	-	-	-	-	-1.32	-
	10 640	<i>EXOC5</i>	-	-	-	-	-1.38	-1.87
	23 025	<i>UNC13A</i>	-	-	-	-	-1.50	-1.27
	9 699	<i>RIMS2</i>	-	-	-	-	-1.62	-
	9 900	<i>SV2A</i>	-	-	-	-	-1.65	-1.51
	25 837	<i>RAB26</i>	-	-	-	-	-1.73	-
	10 814	<i>CPLX2</i>	-	-	-	-	-1.86	-1.99
	6 804	<i>STX1A</i>	-	-	-	-	-2.25	-3.46
	9 066	<i>SYT7</i>	-	-	-	-	-2.47	-2.72
	11 075	<i>STMN2</i>	-	-	-	-	-2.75	-3.69
	114 088	<i>TRIM9</i>	-	-	-	-	-3.16	-3.73
	6 252	<i>RTN1</i>	-	-	-	-	-3.19	-3.94
	6 860	<i>SYT4</i>	-	-	-	-	-3.26	-4.16
	5 865	<i>RAB3B</i>	-	-	-	-	-3.89	-4.76
	57 586	<i>SYT13</i>	-	-	-	-	-4.52	-5.58
	29 106	<i>SCG3</i>	-	-	-	-	-4.58	-5.41
	23 335	<i>WDR7</i>	-	-	-	-	-	-1.26

FC: fold change.

interacting protein (case 1, pancreas and islets). Heat shock proteins (HSP) were over-expressed mainly in the islets from case 1 (*HSPA6* and several genes of the HSP40 family). Altered expression of both pro- and anti-apoptotic genes showed a distinct pattern in each case. Islets showed some common

changes in gene expression, including down-regulation of pro-apoptotic genes: *MLLT11*, *PRUNE2* and *NLRP1*.

Growth and proliferation genes showed distinct patterns of altered expression in the pancreases and in the islets. In cases 1 and 2, *REG4* and *PDGFRA* were up-regulated in both the

Table 7. Differentially expressed genes of the immune system in the pancreas and islets of Type 1 diabetes (T1D) patients.

Function	Locus ID	Symbol	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	
			pancreas	pancreas	pancreas	pancreas	islets	islets	
			Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 1	Case 4	
Antigen presentation	972	<i>CD74</i>	1.93	2.47	2.74	–	–	–	
	1 510	<i>CTSE</i>	–	1.88	1.43	–	–	–	
	1 515	<i>CTSL2</i>	–	–	–1.17	–	–	–	
	1 520	<i>CTSS</i>	2.20	3.59	2.17	0.89	–	–	
	51 752	<i>ERAP1</i>	1.34	1.23	1.91	1.37	–	–	
	64 167	<i>ERAP2</i>	2.82	3.88	–0.54	2.72	–	–	
	3 105	<i>HLA-A</i>	1.49	1.72	1.26	–	–	–	
	3 106	<i>HLA-B</i>	1.68	1.66	1.43	–	–	–1.33	
	3 107	<i>HLA-C</i>	1.79	1.31	1.21	–	3.46	–	
	3 108	<i>HLA-DMA</i>	2.47	2.29	2.12	1.23	–	–	
	3 109	<i>HLA-DMB</i>	1.39	1.26	1.47	–	–	–	
	3 113	<i>HLA-DPA1</i>	1.17	2.38	1.91	–	–	–	
	3 115	<i>HLA-DPB1</i>	1.72	2.22	2.08	–	–	–	
	3 117	<i>HLA-DQA1</i>	2.58	1.77	2.50	1.85	–	–	
	3 119	<i>HLA-DQB1</i>	1.30	–	1.07	–	–	–	
	3 122	<i>HLA-DRA</i>	1.99	2.35	2.65	–	–	–	
	3 123	<i>HLA-DRB1</i>	1.28	2.08	2.12	–	–	–	
	3 126	<i>HLA-DRB4</i>	–	1.89	–1.29	1.08	–	–	
	3 127	<i>HLA-DRB5</i>	1.19	1.65	2.26	–	–	–	
	3 920	<i>LAMP2</i>	1.32	1.09	–	–	–	–	
	27 074	<i>LAMP3</i>	1.41	–	–	–	1.80	1.66	
	10 279	<i>PRSS16</i>	–	–	–	–	1.43	1.53	
	5 699	<i>PSMB10</i>	–2.95	–	–	–	–	–	
	5 696	<i>PSMB8</i>	1.38	1.09	–	–	–	–	
	5 698	<i>PSMB9</i>	2.06	1.67	1.11	1.06	–	–	
	5 718	<i>PSMD12</i>	–	–	–0.94	–	–	–	
	5 994	<i>RFXAP</i>	1.81	–	1.22	1.27	–	–	
	6 890	<i>TAP1</i>	–	–	–0.62	–	–	–	
	6 892	<i>TAPBP</i>	1.11	2.24	1.61	–	–	–	
	Chemotaxis	6 356	<i>CCL11</i>	1.01	2.18	1.97	0.89	–	–
		6 363	<i>CCL19</i>	–	2.04	2.10	–	–	–
		6 347	<i>CCL2</i>	2.90	4.68	3.15	3.41	–	–
		6 364	<i>CCL20</i>	–	3.12	–	–	–	–
		56 477	<i>CCL28</i>	1.82	–	–	–	–	–
		6 348	<i>CCL3</i>	–	1.99	0.89	3.19	–	–
		6 351	<i>CCL4</i>	–	1.65	0.56	1.31	–	–
		1 230	<i>CCR1</i>	–	1.72	–	–	–	–
		1 231	<i>CCR2</i>	1.36	2.74	–	–	–	–
		1 234	<i>CCR5</i>	–	–	0.50	–	–	–
		51 554	<i>CCRL1</i>	–	2.20	–	1.25	–	–
51 192		<i>CKLF</i>	1.14	–	–	–	–	–	
54 918		<i>CMTM6</i>	–	1.20	–	–	–	–	
6 376		<i>CX3CL1</i>	–	2.06	0.94	1.06	–	–	
1 524		<i>CX3CR1</i>	1.51	2.11	1.98	1.35	–	–	
2 919		<i>CXCL1</i>	2.14	3.02	1.57	3.94	–	–	
3 627		<i>CXCL10</i>	–	2.95	–	–	–	–	
6 373		<i>CXCL11</i>	–	1.64	–	2.11	–	–	
6 387		<i>CXCL12</i>	–	–	1.86	2.19	2.10	2.81	
284 340		<i>CXCL17</i>	–	–	1.21	–	–	–	
2 920		<i>CXCL2</i>	–	2.63	1.82	2.87	–	–	
2 921		<i>CXCL3</i>	–	–	–	2.25	–	–	
6 372		<i>CXCL6</i>	2.06	5.00	2.11	2.00	–	–1.53	
4 283		<i>CXCL9</i>	1.24	1.95	0.58	–	–	–	
7 852		<i>CXCR4</i>	2.24	4.49	1.99	2.22	–	–	
57 007		<i>CXCR7</i>	–	–	1.17	–	1.16	1.21	
2 357		<i>FPR1</i>	–	1.62	–	–	–	–	
3 576		<i>IL8</i>	–	3.87	–	4.01	–	–	
Innate immunity		60 489	<i>APOBEC3G</i>	–	1.43	–	–	–	–
		929	<i>CD14</i>	–	1.95	1.09	–	–	–1.59
	64 581	<i>CLEC7A</i>	1.87	2.80	2.05	–	–	–	

Table 7. Continued

Function	Locus ID	Symbol	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			pancreas	pancreas	pancreas	pancreas	islets	islets
			Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 1	Case 4
	10 321	<i>CRISP3</i>	–	3.93	3.32	–	–	–
	1 755	<i>DMBT1</i>	–	2.50	1.65	–	–	–
	2 219	<i>FCN1</i>	–	3.38	0.89	1.09	–	–
	3 656	<i>IRAK2</i>	–	1.68	0.63	–	–	–
	3 934	<i>LCN2</i>	3.39	–	–	–	–	–
	3 959	<i>LGALS3BP</i>	–	–	1.20	–	–	–1.19
	4 057	<i>LTF</i>	1.45	1.52	1.85	–	–	–
	9 450	<i>LY86</i>	–	1.56	1.09	–	–	–
	23 643	<i>LY96</i>	1.78	2.47	2.15	1.37	–	–
	4 069	<i>LYZ</i>	5.05	3.31	3.41	2.39	3.93	–
	4 582	<i>MUC1</i>	2.67	1.54	1.55	1.44	2.03	–
	4 360	<i>MRC1</i>	–	–	–	–	–	–2.43
	5 284	<i>PIGR</i>	2.40	2.22	1.90	–	–	–1.66
	5 806	<i>PTX3</i>	2.22	–	–	2.16	–	–
	5 068	<i>REG3A</i>	2.70	2.80	3.13	2.06	–	–
	130 120	<i>REG3G</i>	–	2.89	2.68	–	–	–
	7 096	<i>TLR1</i>	2.06	1.26	0.83	–	–	–
	7 097	<i>TLR2</i>	–	1.48	0.79	–	–	–
	7 098	<i>TLR3</i>	1.99	1.40	1.12	–	–	–
	7 187	<i>TRAF3</i>	–	1.66	0.66	–	–	–
	85 363	<i>TRIM5</i>	1.08	1.34	–	–	–	–
Inflammation	183	<i>AGT</i>	–	1.97	1.01	–	–2.44	–2.97
	199	<i>AIF1</i>	–	–	1.36	–	–	–
	240	<i>ALOX5</i>	–	–	–	–	–	–1.55
	241	<i>ALOX5AP</i>	1.26	1.32	1.11	–	–	–
	325	<i>APCS</i>	–	1.28	1.49	–	–	–
	8 455	<i>ATRN</i>	1.67	–	0.73	–	–	–
	1 116	<i>CHI3L1</i>	3.15	1.69	1.73	–	–	–
	1 401	<i>CRP</i>	4.76	3.23	3.50	–	–	–
	1 906	<i>EDN1</i>	1.11	0.93	–	3.17	–	–
	2 150	<i>F2RL1</i>	–	–	–0.88	–	–	–
	2 244	<i>FGB</i>	1.46	–	–	–	–	–
	2 266	<i>FGG</i>	5.99	2.20	2.29	1.17	–	–
	2 267	<i>FGL1</i>	–	–	1.12	–	1.40	–
	10 875	<i>FGL2</i>	–	2.19	1.99	–	–	–
	11 251	<i>GPR44</i>	–	–	–	–	–2.01	–1.53
	57 817	<i>HAMP</i>	–	2.02	–2.02	–1.81	–	–
	3 146	<i>HMGB1</i>	1.27	–	–	–	–	–
	3 700	<i>ITIH4</i>	1.18	2.20	0.89	–	–	–
	145 741	<i>NLF1</i>	–	1.20	–	–	–	–
	10 562	<i>OLFM4</i>	3.75	–	0.91	–	–	–
	81 579	<i>PLA2G12A</i>	–	–	1.22	–	–	–
	5 320	<i>PLA2G2A</i>	–	–	0.97	1.31	–	–
	8 399	<i>PLAG2G10</i>	–	–	–	–	–	1.59
	6 281	<i>S100A10</i>	–	–	–	–	2.31	–
	6 283	<i>S100A12</i>	1.21	2.11	–	2.36	–	–
	6 275	<i>S100A4</i>	1.48	3.49	1.00	–	1.51	–
	6 279	<i>S100A8</i>	3.64	3.46	1.58	3.64	–	–
	6 280	<i>S100A9</i>	1.36	1.83	0.64	1.15	–	–
	55 829	<i>SELS</i>	–	–	–0.87	–	–	–
	5 054	<i>SERPINE1</i>	–	–	–1.76	–	–	–
	6 696	<i>SPP1</i>	–1.19	1.87	1.23	–	–	–
	7 078	<i>TIMP3</i>	1.35	1.77	1.47	1.57	–	–
Complement	712	<i>C1QA</i>	–	–	2.03	–	–	–
	713	<i>C1QB</i>	1.74	0.94	2.16	–	–	–
	714	<i>C1QC</i>	1.29	1.49	2.59	–	–	–
	715	<i>C1R</i>	1.69	1.93	1.44	1.12	–	–
	716	<i>C1S</i>	2.62	2.10	1.92	1.59	–	–
	718	<i>C3</i>	2.69	3.02	2.29	–	–	–

Table 7. Continued

Function	Locus ID	Symbol	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			pancreas	pancreas	pancreas	pancreas	islets	islets
			Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 1	Case 4
	719	<i>C3AR1</i>	–	1.66	–	–	–	–
	720	<i>C4A</i>	2.32	3.53	2.38	–	–	–
	721	<i>C4B</i>	–	–	4.00	–	–	–
	722	<i>C4BPA</i>	4.96	1.05	0.60	–	2.26	–1.47
	725	<i>C4BPB</i>	3.38	–	0.52	–	3.05	–
	727	<i>C5</i>	–2.33	–	–	–	–	–
	728	<i>C5AR1</i>	–	2.81	0.80	–	–	–
	729	<i>C6</i>	–	–	0.86	–	–	–
	730	<i>C7</i>	1.39	1.20	1.15	1.45	1.72	–
	966	<i>CD59</i>	1.07	1.36	0.59	–	–	–
	629	<i>CFB</i>	2.33	3.66	2.16	–	–	–
	3 078	<i>CFHR1</i>	–	1.54	1.07	–	–2.01	–2.50
	3 426	<i>CFI</i>	1.42	1.87	2.06	–	–	–
Immunoregulation	4 345	<i>CD200</i>	–	–	–	–	–2.70	–2.56
	11 314	<i>CD300A</i>	–	1.58	0.88	–	–	–
	2 281	<i>FKBP1B</i>	–	–	–1.21	–	–	–
	2 289	<i>FKBP5</i>	1.67	–	–1.04	–	–	–
	3 133	<i>HLA-E</i>	2.23	1.05	1.01	–	–	–
	3 134	<i>HLA-F</i>	1.18	1.34	0.83	–	–	–
	3 135	<i>HLA-G</i>	1.27	1.40	1.13	–	–	–
	10 068	<i>IL18BP</i>	1.80	2.13	1.81	–	–	–
	7 850	<i>IL1R2</i>	1.43	–	–	–	–	–
	3 903	<i>LAIR1</i>	–	1.74	0.95	–	–	–
	3 956	<i>LGALS1</i>	–	1.60	–	–	–	–
	3 957	<i>LGALS2</i>	–	–	1.15	–	2.13	–
	3 965	<i>LGALS9</i>	–	1.32	0.64	–	–	–
	10 859	<i>LILRB1</i>	3.41	3.49	0.83	1.78	–	–
	149 041	<i>RC3H1</i>	–	1.61	–	1.15	–	–
	5 272	<i>SERPINB9</i>	–	–	1.73	–	–	–
	710	<i>SERPING1</i>	2.08	2.12	1.73	–	–	–
	140 885	<i>SIRPA</i>	–	1.85	0.89	–	–	–
	9 021	<i>SOCS3</i>	–	1.77	1.14	1.14	–	–
	10 312	<i>TCIRG1</i>	–	–	–	–	–	1.44
	7 072	<i>TIA1</i>	–	1.45	1.19	–	–	–1.45
	283 131	<i>TncRNA</i>	–1.60	1.67	–	1.39	–	–
	7 128	<i>TNFAIP3</i>	–	1.98	–	–	–	–
	11 326	<i>VSIG4</i>	1.92	1.68	0.92	–	–	–
	79 679	<i>VTCN1</i>	1.57	2.13	1.55	–	–	–
	6 935	<i>ZEB1</i>	–3.19	–	–	–	–	1.62
Adhesion molecules	214	<i>ALCAM</i>	1.30	–	–	–	–1.48	–
	9 936	<i>CD302</i>	1.28	–	1.64	1.64	–	–
	948	<i>CD36</i>	1.97	2.67	1.51	2.39	2.17	1.44
	960	<i>CD44</i>	3.86	1.24	0.94	–	–	–
	961	<i>CD47</i>	1.64	1.51	1.26	1.08	–	–1.25
	962	<i>CD48</i>	–	1.69	–	–	–	–
	4 267	<i>CD99</i>	–	–	1.28	–	–2.28	–2.21
	83 692	<i>CD99L2</i>	–	–	–	–	–	–1.27
	3 383	<i>ICAM1</i>	–	2.34	1.05	1.10	–	–
	3 684	<i>ITGAM</i>	–	1.83	0.97	–	–	–
	3 688	<i>ITGB1</i>	–	–	–	–	–	–1.63
	3 689	<i>ITGB2</i>	1.57	3.24	1.69	–	–	–
	23 421	<i>ITGB3BP</i>	1.27	–	–	–	–	–
	3 694	<i>ITGB6</i>	1.10	–	–	–	–	–
	3 696	<i>ITGB8</i>	–	1.34	–	–	–	–
	3 964	<i>LGALS8</i>	1.89	–	–	–	–	–
	4 162	<i>MCAM</i>	1.10	–	–	1.30	–	–
	5 175	<i>PECAM1</i>	1.90	1.87	1.29	–	–	–
	7 412	<i>VCAM1</i>	1.07	2.83	2.10	1.23	–	–

Table 7. Continued

Function	Locus ID	Symbol	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			pancreas	pancreas	pancreas	pancreas	islets	islets
			Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 1	Case 4
Interferon-responsive	23 586	<i>DDX58</i>	–	–	1.42	–	–	–
	2 633	<i>GBP1</i>	1.97	3.23	0.95	2.63	–	–
	2 634	<i>GBP2</i>	2.83	2.43	–	1.35	–	–
	2 635	<i>GBP3</i>	1.58	–	–	3.45	–	–
	51 191	<i>HERC5</i>	1.71	0.96	0.81	1.61	–	–
	3 428	<i>IFI16</i>	–	1.22	–	–	–	–
	10 437	<i>IFI30</i>	–	2.16	0.8	–	–	–
	10 561	<i>IFI44</i>	1.45	–	0.6	–	–	–
	2 537	<i>IFI6</i>	–	1.66	0.95	–	–	–
	10 581	<i>IFITM2</i>	1.29	1.02	0.73	–	–	–
	10 410	<i>IFITM3</i>	1.05	–	–	–	–	–
	3 455	<i>IFNAR2</i>	–	1.39	–	–	–	–
	3 659	<i>IRF1</i>	–	1.35	–	–	–	–
	3 660	<i>IRF2</i>	–	1.41	1.28	–	–	–
	3 664	<i>IRF6</i>	–	–	–1.12	–	–	–
	3 665	<i>IRF7</i>	–	–	–0.74	–	–	–
	10 379	<i>IRF9</i>	1.36	0.87	–	–	–	–
	4 332	<i>MNDA</i>	2.76	3.58	2.44	1.81	–	–
	4 599	<i>MX1</i>	1.00	1.36	–	–	–	–
	Cytokine signalling	1 436	<i>CSF1R</i>	–	1.78	1.46	–	–
3 587		<i>IL10RA</i>	–	2.29	1.63	–	–	–
3 588		<i>IL10RB</i>	–	1.50	–	–	–	–
3 597		<i>IL13RA1</i>	1.45	–	–	–	–	–
55 540		<i>IL17RB</i>	–	1.25	–0.79	1.79	1.70	1.55
3 554		<i>IL1R1</i>	–	1.76	1.13	–	–	–
58 985		<i>IL22RA1</i>	–	–	–	1.24	2.20	2.46
9 466		<i>IL27RA</i>	–	1.35	–	–	–	–
9 235		<i>IL32</i>	–	–	1.85	–	–	–
3 750		<i>IL6R</i>	–	–	–	–	–	–1.89
3 572		<i>IL6ST</i>	–	2.26	–0.71	1.10	–	–
3 609		<i>ILF3</i>	1.59	–	0.84	–	–	–
4 254		<i>KITLG</i>	2.18	1.34	0.62	0.93	–	–
3 977		<i>LIFR</i>	1.44	1.93	0.86	1.95	1.39	–
10 135		<i>PFEB1</i>	–	1.29	–	1.76	–	–
4 090		<i>SMAD5</i>	–	1.17	–	–	–	–
4 093		<i>SMAD9</i>	–	–	–	–	–1.50	–1.64
10 673		<i>TNFSF13B</i>	–	2.20	1.67	1.02	–	–
7 042		<i>TGFB2</i>	–	2.48	1.40	0.97	–	–1.66
7 048		<i>TGFBR2</i>	–	–	0.92	–	–	–
9 839	<i>ZEB2</i>	–	3.13	1.62	1.59	–	–	
Signalling	84 674	<i>CARD6</i>	–	–	–0.77	–	–	–
	22 900	<i>CARD8</i>	–	–	0.84	–	–	–
	963	<i>CD53</i>	–	1.81	0.89	–	–	–
	80 790	<i>CMIP</i>	–	–	1.02	–	–1.77	–
	28 514	<i>DLL1</i>	–	–	1.06	–	–	–
	1 910	<i>EDNRB</i>	1.54	–	–	1.32	–	–
	2 268	<i>FGR</i>	–	–	0.58	–	–	–
	2 359	<i>FPRL2</i>	–	–	0.84	–	–	–
	2 534	<i>FYN</i>	–	1.66	–	–	–	–
	3 055	<i>HCK</i>	–	1.60	0.57	–	–	–
	3 059	<i>HCLS1</i>	1.91	2.75	1.82	–	–	–
	182	<i>JAG1</i>	–	2.08	1.16	1.68	–	–
	3 716	<i>JAK1</i>	–	1.30	–	1.10	–	–
	9 404	<i>LPXN</i>	–	1.44	–	–	–	–
	4 067	<i>LYN</i>	1.08	1.14	–	–	–	–
	5 341	<i>PLEK</i>	–	2.29	0.84	–	–	–
	122 769	<i>PPIL5</i>	–	–	–1.26	–	–	–
5 530	<i>PPP3CA</i>	–	1.59	0.81	–	–	–	

Table 7. Continued

Function	Locus ID	Symbol	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			pancreas	pancreas	pancreas	pancreas	islets	islets
			Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 1	Case 4
	5 734	<i>PTGER4</i>	–	–	–	1.39	–	2.35
	5 795	<i>PTPRJ</i>	–	2.16	–	1.45	–	–
	10 254	<i>STAM2</i>	–	–	0.96	–	–	–
	353 376	<i>TICAM2</i>	–	–	–	–	–	–1.14
	92 610	<i>TIFA</i>	–	–	–	–	1.78	–
	8 792	<i>TNFRSF11A</i>	0.97	2.42	–	–	–2.61	–2.95
	7 188	<i>TRAF5</i>	–	–	–	–	1.21	–
B cells and immunoglobulins	29 760	<i>BLNK</i>	–	1.91	1.02	1.62	–	–
	8 857	<i>FCGBP</i>	–	1.83	1.74	–	–	–
	3 476	<i>IGBP1</i>	–	–	–	–	1.47	–
	3 493	<i>IGHA1</i>	–	–	1.72	–	–	–
	3 500	<i>IGHG1</i>	–	–	–	–	2.21	–
	3 502	<i>IGHG3</i>	3.47	2.06	1.26	1.81	4.35	–1.35
	3 507	<i>IGHM</i>	–	1.27	–	–	–	–
	3 514	<i>IGKC</i>	–	–	–	–	3.6	–
	28 902	<i>IGKV1D-13</i>	–	–	–	–	1.4	–
	3 535	<i>IGL@</i>	1.21	1.67	0.89	1.16	2.34	–
	28 831	<i>IGLJ3</i>	1.83	2.32	1.34	1.85	2.81	–
	91 353	<i>IGLL3</i>	–	–	–	–	1.33	–
	118 788	<i>PIK3AP1</i>	–	2.00	1.15	–	–	–
Transcription regulation	604	<i>BCL6</i>	–	2.27	–	1.61	–	–
	83 706	<i>FERMT3</i>	–	–	0.73	–	–	–
	2 624	<i>GATA2</i>	–	–	–	–	–	1.52
	9 935	<i>MAFB</i>	–	1.68	–	1.20	–1.37	–
	10 725	<i>NFAT5</i>	–	1.41	0.85	–	–	–
	4 775	<i>NFATC3</i>	–	–1.24	–1.12	–1.34	–	–
	64 332	<i>NFKBIZ</i>	–	–	1.47	–	1.63	–
	10 062	<i>NR1H3</i>	–	–	1.48	–	–	–
	5 971	<i>RELB</i>	–	1.67	0.84	–	–	–
	6 772	<i>STAT1</i>	1.27	1.94	–	–	–	–
	6 925	<i>TCF4</i>	1.26	1.80	0.92	1.40	–	–1.21
	1 831	<i>TSC22D3</i>	–	1.16	–	–	–	–
	222 643	<i>UNC5CL</i>	1.35	–	–	–	–	–
	26 137	<i>ZBTB20</i>	–	1.91	0.96	–	–	–
	7 763	<i>ZFAND5</i>	–	–	–1.09	–	–	–
Apoptosis	597	<i>BCL2A1</i>	1.05	3.65	–	–	–	–
	330	<i>BIRC3</i>	–	2.90	1.00	1.25	–	–
	834	<i>CASP1</i>	–	1.79	0.99	–	–	–
	55 179	<i>FAIM</i>	1.46	–	0.51	0.95	–	–
	55 303	<i>GIMAP4</i>	–	1.49	0.75	–	–	–
	5 552	<i>SRGN</i>	–	–	1.29	–	–	–
	8 797	<i>TNFRSF10A</i>	–	–	–1.38	–	–	–
	55 504	<i>TNFRSF19</i>	1.06	–	1.17	–	–	–
	8 743	<i>TNFSF10</i>	2.27	2.39	0.94	–	–	–
T cells	2 533	<i>FYB</i>	–	–	0.77	–	–	–
	84 868	<i>HAVCR2</i>	–	1.88	0.92	–	–	–
	9 452	<i>ITM2A</i>	1.97	–	–	–	–	–
	3 936	<i>LCP1</i>	0.94	2.08	1.31	–	–	–
	9 840	<i>ONECUT2</i>	–	–	1.25	–	–1.82	–2.67
	5 588	<i>PRKCQ</i>	–	–	0.93	1.38	–	–
	6 503	<i>SLA</i>	–	1.88	–	–	–	–
	7 070	<i>THY1</i>	–	1.91	0.88	–	–	–
	9 760	<i>TOX</i>	–	–	–	–	–2.91	–3.96
Macrophages	54	<i>ACP5</i>	–	1.43	–	–	–	–
	9 332	<i>CD163</i>	1.90	–	–	–	1.63	–2.02
	968	<i>CD68</i>	–	1.38	–	–	–	–
	23 531	<i>MMD</i>	–	1.14	–	–	–	–
	219 972	<i>MPEG1</i>	2.01	3.01	2.37	1.35	–	–
	80 149	<i>ZC3H12A</i>	–	–	–	–	1.90	–

Table 7. Continued

Function	Locus ID	Symbol	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC	Log ₂ FC
			pancreas	pancreas	pancreas	pancreas	islets	islets
			Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 1	Case 4
Neutrophils	57 118	<i>CAMK1D</i>	1.21	–	–	–	–	1.64
	1 511	<i>CTSG</i>	–	–	1.11	–	–	–
	79 887	<i>FLJ22662</i>	–	–	1.75	–	–	–
	4 688	<i>NCF2</i>	–	2.60	1.83	–	–	–
Dendritic cells	57 556	<i>SEMA6A</i>	1.15	1.82	1.36	1.66	–	–
	28 959	<i>TMEM176B</i>	–	–	–	2.44	–1.40	–
	54 209	<i>TREM2</i>	–	1.19	–	–	–	–
Fc receptors	2 207	<i>FCER1G</i>	1.32	2.70	2.49	–	–	–
	2 209	<i>FCGR1A</i>	–	1.74	0.93	–	–	–
	2 210	<i>FCGR1B</i>	–	2.56	1.71	1.01	–	–
Leucocyte markers	1 043	<i>CD52</i>	0.92	4.01	1.53	0.93	–	–
	8 832	<i>CD84</i>	0.99	1.92	1.34	1.25	–	–
	5 788	<i>PTPRC</i>	1.64	3.55	2.25	1.14	–	–
Natural killer (NK) cells	22 914	<i>KLRK1</i>	–	1.27	–	–	–	–
	7 305	<i>TYROBP</i>	1.40	3.14	1.90	–	–	–
Mast cells	7 177	<i>TPSAB1</i>	–	–	1.46	–	–	–
	64 499	<i>TPSB2</i>	–	–	1.51	–	–	–
Miscellaneous								
Cell migration	10 154	<i>PLXNC1</i>	1.40	3.35	2.84	2.13	–1.73	–1.28
	5 420	<i>PODXL</i>	1.42	–	–	–	–	1.46
Cytotoxicity	23 705	<i>CADM1</i>	–	–	1.37	–	–2.60	–2.33
Cytoskeleton	23 075	<i>SWAP70</i>	–	–	–	0.96	–	–
Degranulation	25 801	<i>GCA</i>	1.03	1.25	–	1.00	–	–
Lysosomal protein	7 805	<i>LAPTM5</i>	1.87	3.59	2.35	–	–	–
Cell activation	9 976	<i>CLEC2B</i>	–	–	–	–	1.57	–
Oxidative stress	1 536	<i>CYBB</i>	1.54	3.47	–	1.04	–	–
Phagocytosis	22 918	<i>CD93</i>	–	–	1.34	–	–	–
Platelets	10 461	<i>MERTK</i>	–	1.59	0.76	–	–	–
Proteolysis	290	<i>ANPEP</i>	–	–	0.93	1.49	–	1.84
Tissue repair	81 035	<i>COLEC12</i>	–	1.37	–	1.20	–	–
Vascular endothelium	10 085	<i>EDIL3</i>	–	–	–0.99	–	–3.13	–4.29
Unknown	7 920	<i>BAT5</i>	–	–	–	–	–1.27	–
	11 119	<i>BTN3A1</i>	–	1.41	–	–	–	–
	11 118	<i>BTN3A2</i>	1.33	2.23	1.37	–	–	–
	10 384	<i>BTN3A3</i>	1.74	2.41	1.14	–	–	–
	2 124	<i>EVI2B</i>	–	2.88	–	–	–	–
	168 537	<i>GIMAP7</i>	1.53	1.30	–	1.20	–	–
	10 261	<i>IGSF6</i>	0.93	3.04	1.25	–	–	–
	3 321	<i>ISGF3</i>	–	1.31	–	–	–	–
	4 033	<i>LRMP</i>	–	–	–	–	–	1.43
	7 940	<i>LST1</i>	1.14	2.24	1.29	–	–	–
	3 071	<i>NCKAP1L</i>	–	1.40	–	–	–	–

pancreas and the islets. Only a few genes were up-regulated in the total pancreases, e.g. receptor for fibroblast growth factor (*FGFR2*) and *TBC1D1*. In the islets *TFE3* was down-regulated and *MACROD1* was up-regulated. Stem cell-associated genes prominin 1 was up-regulated in cases 2 and 3 and nestin and *CD133* in case 3.

Validation of the microarray results by qRT-PCR analysis

Using qRT-PCR, differential expression was confirmed in all 16 genes from different categories, i.e. *NMES1*, *CRP*, *REG3A*,

TLR3, *CD44*, *HLA-E*, *CD36*, *S100A8*, *TNFSF10* (TRAIL), *IFNAR2*, *IL8*, *CXCL1*, *INS*, *PNLIP*, *ERAP2* and *PPY*, selected to validate the total pancreas arrays and in the eight genes selected to validate the purified islets arrays, i.e. *CD36*, *INS*, *PPY*, *REG4*, *LYZ*, *CXCL12*, *HSPA6* and *INSR*) (Fig. 4).

Tissue distribution of differentially expressed genes

A selection of the differentially expressed genes identified by microarray analysis was studied by indirect immunofluorescence in pancreatic tissue sections from cases 1 and 4 (Fig. 5). The number of insulin-positive β cells of the islets

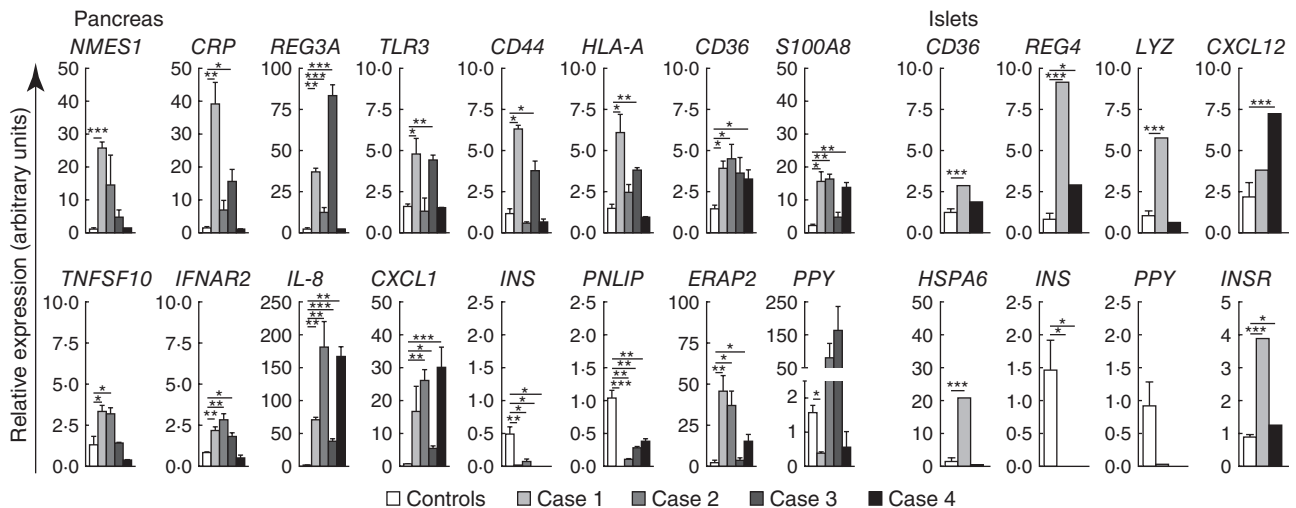


Fig. 4. Quantitative real-time polymerase chain reaction results for selected genes in the Type 1 diabetes (T1D) pancreas and purified islets. Gene expression signals were normalized to *HPRT* and calibrator sample. Results from three independent experiments (mean \pm standard error of the mean) (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). (a) Whole pancreas. White bars are means of three normal pancreases, clear grey bars are means of three to five blocks from case 1, grey bars are means of three blocks from case 2, dark grey bars are means of three blocks from case 3, black bars are means of three blocks from case 4. (b) Purified islets. White bars are means of four islets samples from different donors, clear grey bars correspond to islets from case 1 and black bars correspond to islets from case 4.

was reduced markedly, but some were detected even in case 4 (Fig. 5b) concomitantly with a relative increase of α -cells. Leucocytes (CD45⁺) were seen mainly around the islets (peri-insulinitis), only a few in the islets and fewer still scattered all over the exocrine tissue. As already mentioned (see Immunohistological analysis of insulinitis), leucocytes were more abundant in case 1 than in case 4 (Fig. 5c). B lymphocytes (CD19⁺) were seen in and around the islets and scattered over the exocrine tissue (Fig. 5d). Large areas of exocrine tissue were stained for CRP mainly in case 1 (Fig. 5e). CD44 expression was increased in exocrine areas of case 1 and, occasionally, in the islets (glucagon-negative cells) (Fig. 5f). Most CD44⁺ cells were CD45⁻ (data not shown). Control pancreases showed some CD44⁺ cells in the exocrine tissue. HLA-E expression was increased markedly in the exocrine tissue and in some islets for case 1 (Fig. 5g). CD36 expression was increased in endothelial cells (co-localizing with FVIII, data not shown) for cases 1 and 4 (Fig. 5h). REG3A was clearly increased in the exocrine tissue and in the islets from cases 1 and 4 (Fig. 5i).

Discussion

The results reported here consist of the first validated data set of whole genome expression profiles for human T1D pancreases and islets and its analysis. Overall, the results of the microarray analyses confirm the accepted views of the physiopathology of T1D but also qualify some of them and add some new perspectives.

The study of only four cases compounded with the dispersion of the insular tissue and the uneven distribution of

immunopathological changes in the pancreas makes interpretation of this type of study difficult. There are several arguments that endorse their validity for interpretation: (i) the unbiased nature of the transcriptomic analysis in itself; (ii) the excellent preservation of the starting material; (iii) the consistency of the results with the predictions based on the immunohistological and the bioinformatic analysis; and (iv) the concordance of most data with previous similar studies in other autoimmune diseases and animal models.

On one hand, changes in transcriptomic profiling of an unfractionated tissue may arise from actual modulation of gene expression or from changes in its cell composition [26]. On the other hand, fractionating the tissue also poses problems. We were well aware that is likely that most of the peri-insulinitis was lost in the process of separation and that the islets purified from cases 1 and 4 represent those partially spared by the autoimmune process. We took these problems into account and interpreted the results in the context of the immunohistological data from the same tissue and by comparing the profiles of total pancreas and the islets.

Among the results we would like to highlight four aspects, as follows.

1. Collectively, the expression profile of immune response and inflammatory genes confirms the predictions from previous studies but suggests some nuances to current views on the immunopathogenesis of T1D: (i) the implication of innate immunity and inflammatory pathways seems broader and more maintained than expected as encompasses IL-1, IL-6, TLRs, type I and type II interferon pathways, this differently from the non-obese

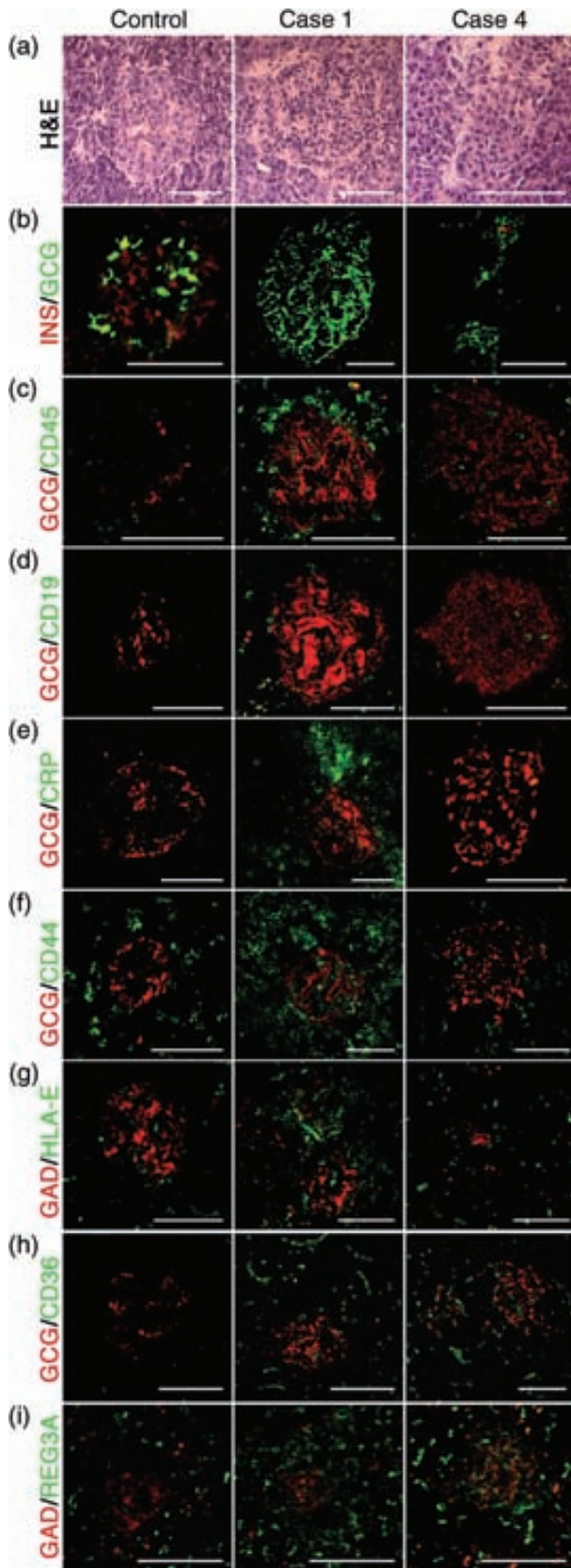


Fig. 5. Double immunofluorescence staining of pancreatic cryostat sections from cases 1 and 4 and control. Left column: control pancreas; middle column: case 1; right column case 4. From top to bottom, haematoxylin and eosin staining (a), insulin (INS)/glucagon (GCG) (b), GCG/CD45 (c), GCG/CD19 (d), GCG/CRP (e), GCG/CD44 (f), glutamic acid decarboxylase (GAD)/human leucocyte antigen E-related (HLA-E) (g), GCG/CD36 (h) and GAD/REG3A (i). INS, GCG and GAD are islet markers. Magnification $\times 200$. Bars = 100 μm .

diabetic (NOD) mice where there the signature points clearly to the Type II IFN pathway [27]; (ii) the prominence of Ig transcripts in the profiling suggests that β cells may be activated by up-regulated B cell activating factor (BAFF). It is plausible that B cells play a regulatory rather than an effector role, a possibility that deserves further investigation [28]; (iii) the limited scope of adaptive response genes expressed – HLA and Ig but no transcripts for cytokines and T cell-specific genes – can be attributed to the low sensitivity of the arrays to detect cytokines [29] and to the limited transcription activity of the effector lymphocytes. The implication is that the activation and expansion of the T cell response did not occur *in situ* and underlines the need to analyse pancreas and pancreatic lymph nodes in parallel (when feasible) [30]; and (iv) the variety of transcripts corresponding to inhibitory pathways suggests that regulatory and repair responses co-exist within the autoimmune process. Finally, the over-expression of natural immunity and IFN-responsive genes do not prove the link of T1D and enterovirus infections but certainly justifies further effort to identify a viral agent in T1D pancreas.

2. The loss of β cell-specific transcripts was expected, but the detection of insulin message in islets 8–10 years after diagnosis and its confirmation by qPCR and IFL would agree with the concept that the destruction is a slow ongoing process. On the other hand, the over-expression of REG4 in the islets indicates that β cell destruction is probably compensated partially by regeneration [31,32]. There is evidence that REG proteins are involved in inflammation [33] and are putative autoantigens [32], and their over-expression may also contribute to the perpetuation of autoimmunity, resulting in a relapsing–remitting process [34].
3. The strong reduction of neural specific genes confirms that β cells are not the sole targets of the autoimmune response, fitting well with the reported responses to neural antigens and the destruction of peri-islet Schwann cells in NOD mice [35,36].
4. The reduction in exocrine-specific gene transcripts is, in fact, a confirmation [4,37], but gives support to little-noticed reports on a concomitant autoimmune response to exocrine pancreas in T1D with antibodies to carbonic anhydrase II and lactoferrin [38]. The detection of CRP and other changes in the acini supports this possibility.

In the last few years some genome expression profile studies that included the analysis of the target organ/tissue have been reported for the main autoimmune diseases, e.g. systemic lupus erythematosus [39], rheumatoid arthritis [40], autoimmune thyroiditis [41], multiple sclerosis [42] and Sjögren's syndrome [43,44]. A broad spectrum of immune response genes were found to be over-expressed in these diseases, mainly in the subcategories of IFN response, HLA, antigen presentation, complement, immunoglobulins and chemokines. The so-called 'IFN signature' was the most common finding [45]. Our results indicate that in T1D the general pathways of the immune response are also activated and that larger data sets of patients stratified by age, gender and disease stage will be required to identify the common and the specific pathways of the different autoimmune diseases.

Whole genome transcriptomic profiling has been applied widely to the animal models of autoimmune diseases, including the NOD mouse [27,46]. The results of our study are similar in many respects to previous studies in the pancreas and islets of the NOD mouse [47]. However, some differences are also observed, including the absence of the reduction in B lymphocyte gene transcripts seen in diabetic mice or the low levels of cytokines (but not chemokines) in our T1D samples [48]. These differences could be due to the very different design of the study or also to the differences between human and NOD mouse T1D. Studies using similar designs in both species would help in the interpretation of these type of experiments but also to establish which aspects of T1D can be addressed in the NOD model [49].

The data presented here favour the view that T1D is caused by a chronic inflammatory process with a strong participation of innate immunity that progresses in spite of the regulatory and regenerative mechanisms. Finally, and more importantly, these results constitute a very valuable data set, which should grow with the analysis of pancreas and islets from T1D patients using the approaches outlined in this paper, carried out by others in possession of the relevant tissues, in order that our work can be built upon, data pooled and a consensus reached. In these future analyses, important substudies will include whether it is better to use fractionated or unfractionated tissue and what different information the different preparations provide; and also, perhaps, to use additional approaches, such as laser microdissection, as a means to isolate tissue fractions of interest. Such resources will be a very valuable asset for diabetes research.

Acknowledgements

We thank Dr R. Gomis (Hospital Clinic, Barcelona, Spain) for providing case 3 pancreas. We thank Dr D. Geraghty (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, USA) for antibody to HLA-E and Dr R. Vilella (Hospital

Clinic, Barcelona, Spain) for antibodies to CD45 and CD19. This work was supported by grants from the Juvenile Diabetes Foundation International (JDRF 5-2007-269) and Spanish Ministry of Health (FIS 06/0465 and PI081405). R. P. was supported by the Instituto de Salud Carlos III (FI05/00418). M. V. P. was supported by the stabilization programme of biomedical researchers of the Instituto de Salud Carlos III, Spanish Ministry of Health and from the Direcció d'Estratègia i Coordinació, Health Department, Generalitat de Catalunya. J. V. is an associate professor of the Serra-Hunter Program, Catalan Government.

Disclosure

None.

References

- 1 Chatenoud L, Bach JF. Tolerance to islet autoantigens in type 1 diabetes. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**:131–6.
- 2 Foulis AK, Stewart JA. The pancreas in recent onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. *Diabetologia* 1984; **26**:456–61.
- 3 Foulis AK, Farquharson MA. Aberrant expression of HLA DR antigens in insulin containing beta cells in recent onset type 1 diabetes mellitus. *Diabetes* 1986; **35**:1215–24.
- 4 Foulis AK, Liddle C, Farquharson MA. The histopathology of the pancreas of type 1 diabetes: a 25 year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 1986; **29**:267–74.
- 5 Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C *et al.* Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus: changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V β usage, and cytokine profile. *J Immunol* 1994; **153**:1360–77.
- 6 Bottazzo GF, Dean B, McNally GM, McKay EH, Swift PGF, Gamble DR. *In situ* characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic Insulinitis. *N Engl J Med* 1985; **313**:353–60.
- 7 Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen G, Nikolakaros G, Simell O. Macrophages, T cell receptor usage and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; **90**:1901–10.
- 8 Dotta F, Censini S, van Halteren AGS *et al.* Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:5115–20.
- 9 Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2009; **155**:173–81.
- 10 Imagawa A, Hanafusa T, Tamura S *et al.* Pancreatic biopsy as a procedure for detecting *in situ* autoimmune phenomena in type 1 diabetes: close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes* 2001; **50**:1269–73.
- 11 Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. The

- prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 2009; **52**:1143–51.
- 12 Maas K, Chan S, Parker J *et al*. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol* 2002; **169**:5–9.
 - 13 Kaizer EC, Glaser C, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, White PC. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**:3705–11.
 - 14 Wang X, Jia S, Geoffrey R, Alemzadeh R, Ghosh S, Hessner MJ. Identification of a molecular signature in human type 1 diabetes mellitus using serum and functional genomics. *J Immunol* 2008; **180**:1929–37.
 - 15 Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988; **37**:413–20.
 - 16 Irizarry RA, Hobbs B, Collin F *et al*. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; **4**:249–64.
 - 17 Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; **3**:Article 3.
 - 18 Benjamini Y, Hochberg HY. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B* 1995; **57**:289–300.
 - 19 Sabater L, Ferrer-Francesch X, Sospedra M, Caro P, Juan M, Pujol-Borrell R. Insulin alleles and autoimmune regulator (AIRE) gene expression both influence insulin expression in the thymus. *J Autoimmun* 2005; **25**:312–8.
 - 20 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F *et al*. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; **3**:RESEARCH0034.
 - 21 Livak KJ, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods* 2001; **25**:402–8.
 - 22 Kendzierski C, Irizarry RA, Chen KS, Haag JD, Gould MN. On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**:4252–7.
 - 23 Reis ES, Barbuto JA, Isaac L. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. *Inflamm Res* 2006; **55**:179–84.
 - 24 Bots M, Medema JP. Serpins in T cell immunity. *J Leukoc Biol* 2008; **84**:1238–47.
 - 25 Riesle E, Friess H, Zhao L *et al*. Increased expression of transforming growth factor beta s after acute oedematous pancreatitis in rats suggests a role in pancreatic repair. *Gut* 1997; **40**:73–9.
 - 26 Hyatt G, Melamed R, Park R *et al*. Gene expression microarrays: glimpses of the immunological genome. *Nat Immunol* 2006; **7**:686–91.
 - 27 Matos M, Park R, Mathis D, Benoist C. Progression to islet destruction in a cyclophosphamide-induced transgenic model: a microarray overview. *Diabetes* 2004; **53**:2310–21.
 - 28 Silveira PA, Grey ST. B cells in the spotlight: innocent bystanders or major players in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2006; **17**:128–35.
 - 29 Park WD, Stegall MD. A meta-analysis of kidney microarray datasets: investigation of cytokine gene detection and correlation with rt-PCR and detection thresholds. *BMC Genomics* 2007; **8**:88.
 - 30 Kent SC, Chen Y, Bregoli L *et al*. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature* 2005; **435**:224–8.
 - 31 Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 2005; **48**:2221–8.
 - 32 Gurr W, Yavari R, Wen L *et al*. 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* 2002; **51**:339–46.
 - 33 Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 2006; **313**:1126–30.
 - 34 von Herrath M, Sanda S, Herold K. Type 1 diabetes as a relapsing–remitting disease? *Nat Rev Immunol* 2007; **7**:988–94.
 - 35 Winer S, Tsui H, Lau A *et al*. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* 2003; **9**:198–205.
 - 36 Carrillo J, Puertas MC, Alba A *et al*. Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements. *Diabetes* 2005; **54**:69–77.
 - 37 Creutzfeldt W, Gleichmann D, Otto J, Stockmann F, Maisonneuve P, Lankisch PG. Follow-up of exocrine pancreatic function in type-1 diabetes mellitus. *Digestion* 2005; **72**:71–5.
 - 38 Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M *et al*. High prevalence of autoantibodies against carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes: concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. *Pancreas* 2003; **27**:26–30.
 - 39 Peterson KS, Huang JF, Zhu J *et al*. Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *J Clin Invest* 2004; **113**:1722–33.
 - 40 van der Pouw Kraan TC, van Gaalen FA, Huizinga TW, Pieterman E, Breedveld FC, Verweij CL. Discovery of distinctive gene expression profiles in rheumatoid synovium using cDNA microarray technology: evidence for the existence of multiple pathways of tissue destruction and repair. *Genes Immun* 2003; **4**:187–96.
 - 41 Aust G, Krohn K, Morgenthaler NG *et al*. Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis in monozygotic twins: case study as well as transcriptomic and immunohistological analysis of thyroid tissues. *Eur J Endocrinol* 2006; **154**:13–20.
 - 42 Lock C, Hermans G, Pedotti R *et al*. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002; **8**:500–8.
 - 43 Hjelmervik TO, Petersen K, Jonassen I, Jonsson R, Bolstad AI. Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjogren's syndrome patients from healthy control subjects. *Arthritis Rheum* 2005; **52**:1534–44.
 - 44 Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C *et al*. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**:2770–5.
 - 45 Baechler EC, Batliwalla F, Reed AM *et al*. Gene expression profiling in human autoimmunity. *Immunol Rev* 2006; **210**:120–37.
 - 46 Vukkadapu SS, Belli JM, Ishii K *et al*. Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse. *Physiol Genomics* 2005; **21**:201–11.

- 47 Kodama K, Butte AJ, Creusot RJ *et al.* Tissue- and age-specific changes in gene expression during disease induction and progression in NOD mice. *Clin Immunol* 2008; **129**:195–201.
- 48 Poirot L, Benoist C, Mathis D. Natural killer cells distinguish

- innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**:8102–7.
- 49 von Herrath M, Nepom T. Animal models of human type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2009; **10**:129–32.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Atkinson MA, McLaren NK. *The pathogenesis of insulin dependent diabetes*. N Engl J Med, 1994. 331:1428-1436.
2. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care 1998. 21[Suppl.2]:B1-B67.
3. American Diabetes Association. *Standards of medical care in diabetes--2007*. Diabetes Care, 2007. 30[Suppl 1]:S4-S41.
4. Klinke DJ II. *Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus*. PLOS ONE, 2008(1):e1374.
5. Eisenbarth GS. *Update in type 1 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(7):2403-2407.
6. Skyler JS, Hollander PA, Jovanovic L et al. *Safety and efficacy of inhaled human insulin (Exubera) during discontinuation and readministration of therapy in adults with type 1 diabetes: A 3-year randomized controlled trial*. Diabetes Res Clin Pract, 2008. 82(2): 238-46.
7. Zhao Y, Ye W, Boye KS. *Healthcare charges and utilization associated with diabetic neuropathy: impact of type 1 diabetes and presence of other diabetes-related complications and comorbidities*. Diabetic medicine, 2009. 26:61-69.
8. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1993. 329(14):977-86.
9. American Diabetes Association. *Economic costs of diabetes in the US in 2007*. Diabetes Care, 2008. 31:596-615.
10. Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, Libman I, LaPorte R, Tuomilehto J. *Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide*. Diabetes Care, 2000. 23:1516-1526.
11. Muntoni S, Fonte MT, Stoduto S et al. *Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus among Sardinian heritage children born in Lazio region, Italy*. Lancet, 1997. 349:160-162.
12. Gale EAM. *The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th*. Diabetes, 2002. 51:3353-3361.
13. Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J. *Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends*. Diabetologia, 1999. 42(12):1395-403.
14. Komulainen J, Kulmala P, Savola K et al. *Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of very young children with type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group*. Diabetes Care, 1999. 22(12):1950-5.

15. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. *Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study.* Lancet, 2009. 373(9680):2027-33.
16. Shoda LK, Young DL, Ramanujan S et al. *A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation.* Immunity, 2005. 23(2):115-26.
17. You S, Candon S, Kuhn C, Bach JF, Chatenoud L. *CD3 antibodies as unique tools to restore self-tolerance in established autoimmunity their mode of action and clinical application in type 1 diabetes.* Adv Immunol, 2008. 100:13-37.
18. Uibo R, Lernmark A. *GAD65 autoimmunity-clinical studies.* Adv Immunol, 2008. 100:39-78.
19. Onegut-Gumuscu S, Concannon P. *Mapping genes for autoimmunity in humans: type 1 diabetes as a model.* Immunological Reviews, 2002. 190:182-194.
20. Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, Koskenvuo M, Tuomilehto J. *Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study.* Diabetes, 2003. 52(4):1052-5.
21. Nerup J, Platz P, Andersen OO et al. *HL-A antigens and diabetes mellitus.* Lancet, 1974. 2:864-6.
22. Ounissi-Benkhalha H, Polychronakos C. *The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms.* Trends Mol Med, 2008. 14(6):268-75.
23. Todd JA, Mijovic C, Fletcher J, Jenkins D, Bradwell AR, Barnett AH. *Identification of susceptibility loci for insulin-dependent diabetes mellitus by trans-racial gene mapping.* Nature, 1989. 338(6216):587-9.
24. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. *Breeding of a non-obese diabetic strain of mice.* Exp Anim, 1980. 29:1-13.
25. Nejentsev S, Howson JM, Walker NM et al. *Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A.* Nature, 2007. 450:887-92.
26. Bennet ST, Lucassen AM, Gough SC et al. *Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus.* Nat Gen, 1995. 9:284-92.
27. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A et al. *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, 1997. 15:293-297.
28. Bottini N, Musumeci L, Alonso A et al. *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes.* Nat Genet, 2004. 36(4):337-8.
29. Smyth D, Cooper JD, Collins JE et al. *Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus.* Diabetes, 2004. 53(11):3020-3.

30. Nistico L, B.R., Pritchard Le et al, *The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry.* Hum Mol Genet, 1996. 5: p. 1075-80.
31. Ueda H, Howson JM, Esposito L et al. *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease.* Nature, 2003. 423:505-11.
32. Vella A, Cooper JD, Lowe CE et al. *Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms.* Am J Hum Genet, 2005. 76(5):773-9.
33. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T et al. *Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes.* Nat Genet, 2007. 39(9):1074-82.
34. Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R et al. *A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region.* Nat Genet, 2006. 38(6):617-9.
35. Liu S, Wang H, Jin Y et al. *IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells.* Hum Mol Genet, 2009. 18(2):358-65.
36. Bailey R, Cooper JD, Zeitels L et al. *Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes.* Diabetes, 2007. 56:2616-21.
37. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Vitamin D supplement in early childhood and risk for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus.* Diabetologia, 1999. 42: p. 51-4.
38. Hakonarson H, Grant SF, Bradfield JP. *A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene.* Nature, 2007. 448(7153):591-4.
39. Moore F, Colli ML, Cnop M et al. *PTPN2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates interferon-gamma-induced pancreatic beta-cell apoptosis.* Diabetes, 2009. 58(6):1283-91.
40. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P et al. *Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes.* Nat Genet, 2009. 41:703-7.
41. Bodansky HJ, Staines A, Stephenson C, Haigh D, Cartwright R. *Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a transmigratory population.* BMJ, 1992. 304:1020-22.
42. Gamble DR, Taylor KW, *Seasonal incidence of diabetes mellitus.* BMJ, 1969. 3:631-3.
43. Salminen K, Sadeharju K, Lönrot M et al. *Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study.* J Med Virol, 2003. 69:91-8.
44. Banatvala JE, Bryant J, Scherthaner G et al. *Coxsackie B, mumps, rubella and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria and Australia.* Lancet, 1985. 1:1409-12.

45. Foulis AK, Farquharson M, Meager A. *Immunoreactive interferon in insulin secreting β cells in type 1 diabetes mellitus*. Lancet, 1987. 2:1423-7
46. Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C et al. *Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus: changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V β usage, and cytokine profile*. J Immunol, 1994. 153:1360-77.
47. Huang X, Yuang J, Goddard A et al. *Interferon expression in the pancreases of patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 1995. 44:658-64
48. Hyöty H, Taylor KW, *The role of viruses in human diabetes*. Diabetologia, 2002. 45: 1353-61.
49. Jun HS, Yoon J. *Viral infections and type 1 diabetes*. Infection and autoimmunity, ed. Elsevier, 2004. 229-49.
50. Hiemstra HS, Schloot N, van Veelen PA et al. *Citomegalovirus and autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase*. Proc Natl Acad Sci USA, 2001. 98:3988-91.
51. Ou D, Mitchell L, Metzger DL, Gillam S, Tingle AJ. *Crossreactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognized by T cells of patients with type 1 diabetes mellitus*. Diabetologia, 2000. 43:750-62.
52. von Herrath MG, Fujinami RS, Whitton JL. *Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile?* Nat Rev Microbiol, 2003. 1(2):151-7.
53. Gamble DR. *Relation of antecedent illness to development of diabetes in children*. Br Med J, 1980. 2: p. 99-101.
54. Helmke K, Otten A, Willems W. *Islet cell antibodies in children with mumps infection*. Lancet, 1980. 2:211-12.
55. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Yagihaski S et al. *Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: increase prevalence of islet cell surface antibodies*. Diabetologia, 1984. 27:87-9.
56. Pak CY, Eun HM, McArthur RG, Yoon JW. *Association of citomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes*. Lancet, 1988. 2:1-4.
57. Parkonnen F, Hyöty H, Ilonen J, Reijonen H, Ylä-Herttuala S, Leinikki P. *Antibody reactivity to an Epstein-Barr virus BERF4-encoded epitope occurring also in Asp-57 region of HLA-DQ8 beta chain*. Clin Exp Immunol, 1994. 95:287-93.
58. Conrad B, Weissmahr RN, Böni J, Arcari R, Schüpbach J, Mach B. *A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes*. Cell, 1997. 90:303-13.
59. Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL et al. *Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes*. Diabetes, 2000. 49:1319-24.

60. Lönnrot M, Korpela K, Knip M et al. *Enterovirus RNA in serum is a risk factor for beta-cell autoimmunity and clinical type 1 diabetes: a prospective study. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group.* J Med Virol, 2000. 61(2):214-20.
61. Varela-Calvino R, Peakman M. *Enteroviruses and type 1 diabetes.* Diabetes Metab Res Rev, 2003. 19:431-41.
62. Szopa TM, Ward T, Taylor KW. *Impaired metabolic functions in human pancreatic islets following infection with Coxsackie B4 virus in vitro.* Diabetologia, 1986. 30:587 (Abstract)
63. Dotta F, Censini S, van Halteren AGS et al. *Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients.* Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104:5115-20.
64. Varela-Calvino R, Ellis R, Sgarbi G, Dayan CM, Peakman M. *Characterization of the T-cell response to coxsackievirus B4: evidence that effector memory cells predominate in patients with type 1 diabetes.* Diabetes, 2002. 51:1745-53.
65. Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. *Virus-induced diabetes mellitus: isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis.* N Engl J Med, 1979. 300:1173-79.
66. Hanafusa T, Imagawa A. *Fulminant type 1 diabetes: a novel clinical entity requiring special attention by all medical practitioners.* Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. 3(1):36-45.
67. Tanaka S, Nishida Y, Aida K et al. *Enterovirus infection, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10), and CXCR3 circuit: a mechanism of accelerated beta-cell failure in fulminant type 1 diabetes.* Diabetes, 2009. 58(10):2285-91.
68. Cooke A. *Infection and autoimmunity.* Blood Cells Mol Dis, 2009. 42(2):105-7.
69. Rosu V, Ahmed M, Paccagnini D et al. *Specific immunoassays confirm association of Mycobacterium avium Subsp. paratuberculosis with type-1 but not type-2 diabetes mellitus.* PLoS One, 2009. 4(2):e4386.
70. Carvalho L, Sun J, Kane C, Marshall F, Crawczyk C, Pearce EJ. *Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function.* Immunology, 2009. 126(1):28-34.
71. Liu Q, Sundar K, Mishra PK et al. *Helminth infection can reduce insulinitis and type 1 diabetes through CD25- and IL-10-independent mechanisms.* Infect Immun, 2009. 77(12):5347-58.
72. Seiskari T, Kondrashova A, Viskari H et al. *Allergic sensitization and microbial load--a comparison between Finland and Russian Karelia.* Clin Exp Immunol, 2007. 148(1):47-52.
73. Bach JF. *The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases.* N Engl J Med, 2002. 347(12):911-20.
74. Bach JF. *Infections and autoimmunity.* J Autoimmun, 2005. 25:74-80.

75. Filippi CM, Estes EA, Oldham JE, von Herrath MG. *Immunoregulatory mechanisms triggered by viral infections protect from type 1 diabetes in mice*. J Clin Invest, 2009. 119(6):1515-23.
76. Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M et al. *Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse*. Diabetologia, 2005. 48(8):1565-75.
77. Vaarala O, Atkinson MA, Neu J. *The "perfect storm for type 1 diabetes". The complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity*. Diabetes, 2008. 57:2555-62.
78. Wen L, Ley RE, Volchkov PY et al. *Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes*. Nature, 2008. 455(7216):1109-13.
79. Akerblom HK, Knip M. *Putative environmental factors in type 1 diabetes*. Diabetes Metab Rev, 1998. 14:31-67.
80. Lefebvre DE, Powell KL, Strom A, Scott FW. *Dietary proteins as environmental modifiers of type 1 diabetes mellitus*. Annu Rev Nutr, 2006. 26:175-202.
81. Mathieu C, Badenhoop K. *Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art*. Trends Endocrin Met, 2005. 16:261-6.
82. Mohr SB, Garland CF, Gorham ED, Garland FC. *The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide*. Diabetologia, 2008. 51: p. 1391-98.
83. Penna G, Amuchastegui S, Giarratana N et al. *1,25-dihydroxyvitamin d3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells*. J Immunol, 2007. 178(1):145-53.
84. Myers MA, Hettiarachchi K, Ludeman JP, Wilson AJ, Wilson CR, Zimmet PZ. *Dietary microbial toxins and type 1 diabetes*. Ann NY Acad Sci, 2003. 1005:418-22.
85. Sepa A, Wahlberg J, Vaarala O, Frodi A, Ludvigsson J. *Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy*. Diabetes Care, 2005. 28:290-95.
86. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 3a edición, Masson, Barcelona, 2003.
87. Weir GC, Bonner-Weir S. *Islets of Langerhans: the puzzle of intra-islet interactions and their relevance to diabetes*. J Clin Invest, 1990. 85:983-87.
88. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. Proc Natl Acad Sci USA, 2006. 103(7):2334-9.
89. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB. *α -cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains*. Endocr Rev, 2007. 28(1):84-116.
90. Nyman LR, Wells KS, Head WS et al. *Real-time, multidimensional in vivo imaging used to investigate blood flow in mouse pancreatic islets*. J Clin Invest, 2008. 118: 3790-7.

91. Persson-Sjögren S, Zashihin A, Forsgren S. *Nerve cells associated with the endocrine pancreas in young mice: an ultrastructural analysis of the neuroinsular complex type I.* Histochem J, 2001. 33(6):373-8.
92. Tsui H, Winer S, Chan Y et al. *Islet glia, neurons, and β cells. The neuroimmune interface in the pathogenesis of type 1 diabetes.* Immunology of diabetes V: Ann NY Acad Sci, 2008. 1150:32-42.
93. Feutren G, Mihatsch MJ. *Risk factors for cyclosporine-induced nephropathy in patients with autoimmune diseases. International kidney biopsy registry of cyclosporine in autoimmune diseases.* N Engl J Med, 1992. 326(25):1693-5.
94. Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K et al. *Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation.* Lancet, 1993. 341:1243-4.
95. Barker J. *Type 1 diabetes associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening.* J Clin Endocrinol Metab, 2006. 91(4):1210-7.
96. Winer S, Tsui H, Lau A et al. *Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive.* Nat Med, 2003. 9(2):198-205.
97. Jasinski MJ, Eisenbarth GS. *Insulin as a primary autoantigen for type 1A diabetes.* Clin Dev Immunol, 2005. 12(3):181-6.
98. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. *Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies.* Lancet, 1974. 2:1279-83.
99. Atkinson MA, Maclaren NK. *Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes.* J Clin Invest, 1993. 92(4):1608-16.
100. Tsirogianni A, Papi E, Soufleros K. *Specificity of islet cell autoantibodies and coexistence with other organ specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus.* Autoimm Rev, 2009. 8(8):687-91.
101. Oak S, Gilliam LK, Landin-Olsson M et al. *The lack of anti-idiotypic antibodies, not the presence of the corresponding autoantibodies to glutamate decarboxylase, defines type 1 diabetes.* Proc Natl Acad Sci USA, 2008. 105(14):5471-6.
102. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L et al. *The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes.* Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104(43):17040-5.
103. Bingley PJ, Christie M, Bonifacio E et al. *Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives.* Diabetes, 1994. 43:1304-10.
104. Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO. *Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes.* Clin Exp Immunol, 2007. 148(1):1-16.
105. Kent S, Chen Y, Breglio L et al. *Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope.* Nature, 2005. 435:224-8.

106. Pinkse GG, Boitard C, Tree TI, Peakman M, Roep BO et al. *Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005. 102(51):18425-30.
107. Seyfert-Margolis V, Gisler TD, Asare AL et al. *Analysis of T-cell assays to measure autoimmune responses in subjects with type 1 diabetes: results of a blinded controlled study*. Diabetes, 2006. 55(9):2588-94.
108. Herold KC, Brooks-Worrell B, Palmer J et al. *Validity and reproducibility of measurement of islet autoreactivity by T-cell assays in subjects with early type 1 diabetes*. Diabetes, 2009. 58(11): 2588-95.
109. Uno S, Imagawa A, Okita K et al. *Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor- α in patients with recent-onset type 1 diabetes*. Diabetologia, 2007. 50:596-601.
110. Hoglund P, Mintern J, Waltzinger C, Heath W, Benoist C, Mathis D. *Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes*. J Exp Med, 1999. 189(2):331-9.
111. Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M et al. *HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumour necrosis factor or lymphotoxin*. Nature, 1987. 326:304-6.
112. Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR. *In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis*. N Engl J Med, 1985. 313(6):353-60.
113. Vives-Pi M, Armengol MP, Alcalde L et al. *Expression of transporter associated with antigen processing-1 in the endocrine cells of human pancreatic islets: effect of cytokines and evidence of hyperexpression in IDDM*. Diabetes, 1996. 45(6):779-88.
114. Matzinger P, *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. 296(5566):301-5.
115. Vives-Pi M, Somoza N, Fernández-Álvarez J et al. *Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells*. Clin Exp Immunol, 2003. 133(2):208-18.
116. Lang KS, Recher M, Junt T et al. *Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease*. Nat Med, 2005. 11(2):138-45.
117. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. *Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells*. J Pathol, 1991. 165(2):97-103.
118. Cardozo AK, Proost P, Gysemans C, Chen MC, Mathieu C, Eizirik DL. *IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat*

- pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice.* Diabetologia, 2003. 46(2):255-66.
119. Flodstrom-Tullberg M, Bryceson YT, Shi FD, Hoglund P, Ljunggren HG. *Natural killer cells in human autoimmunity.* Curr Opin Immunol, 2009. 21(6): 634-40.
120. Rodacki M, Svoren B, Butty V et al. *Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients.* Diabetes, 2007. 56(1):177-85.
121. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. *Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes.* Clin Exp Immunol, 2008. 155:173-81.
122. Mandrup-Poulsen T. *Beta cell death and protection.* Ann N Y Acad Sci, 2003. 1005:32-42.
123. Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. *Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities.* Diabetes, 2005. 54 Suppl 2:S97-107.
124. Kyewski B, Klein L. *A central role for central tolerance.* Annu Rev Immunol, 2006. 24:571-606.
125. Sabater L, Ferrer-Francesch X, Sospedra M, Caro P, Juan M, Pujol-Borrell R. *Insulin alleles and autoimmune regulator (AIRE) gene expression both influence insulin expression in the thymus.* J Autoimmun, 2005. 25(4):312-318.
126. Panigrahi AK, Goodman NG, Eisenberg RA, Rickels MR, Naji A, Luning Prak ET. *RS rearrangement frequency as a marker of receptor editing in lupus and type 1 diabetes.* J Exp Med, 2008. 205(13):2985-94.
127. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. *Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes.* Diabetes, 2005. 54(1):92-9.
128. Yip L, Sheng D, Chang P et al., *Deaf1 isoforms control the expression of genes encoding peripheral tissue antigens in the pancreatic lymph nodes during type 1 diabetes.* Nat Immunol, 2009. 10(9):1026-33.
129. Imagawa A, Hanafusa T, Tamura S et al. *Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes.* Diabetes, 2001. 50:1269-73.
130. Hänninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O. *Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus.* J Clin Invest, 1992. 90:1901-10.
131. Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A et al. *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, 1993. 92:2313-22..
132. Foulis AK, Farquharson MA. *Aberrant expression of HLA-DR antigens by insulin-containing beta-cells in recent-onset type 1 diabetes mellitus.* Diabetes, 1986. 35(11):1215-24.

133. Moriwaki M, Itoh N, Miyagawa J et al. *Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset type I diabetes mellitus.* Diabetologia, 1999. 42:1332-40.
134. Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. *The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes.* Diabetologia, 2009. 52(6):1143-51.
135. Imagawa A, Hanafusa T, Itoh N et al. *Islet-infiltrating T lymphocytes in insulin-dependent diabetic patients express CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2).* J Autoimmun, 1996. 9(3):391-6.
136. Mestas J, Hughes CC. *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.* J Immunol, 2004. 172:2731-8.
137. von Herrath M, Nepom GT. *Animal models of human type 1 diabetes.* Nat Immunol, 2009. 10(2):129-32.
138. Watanabe T, Yonemura Y, Yonekura H et al., *Pancreatic beta-cell replication and amelioration of surgical diabetes by Reg protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(9):3589-92.
139. Lenzen S. *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.* Diabetologia, 2008. 51(2):216-26.
140. Like AA, Rossini AA. *Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus.* Science, 1976. 193(4251):415-7.
141. Harada M, Makino S. *Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes-prone mice by cyclophosphamide.* Diabetologia, 1984. 27(6):604-6.
142. Matos M, Park R, Mathis D, Benoist C. *Progression to islet destruction in a cyclophosphamide-induced transgenic model: a microarray overview.* Diabetes, 2004. 53(9):2310-21.
143. Yasunami R, Bach JF. *Anti-suppressor effect of cyclophosphamide on the development of spontaneous diabetes in NOD mice.* Eur J Immunol, 1988. 18(3):481-4.
144. Turk JL, Parker D. *Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms.* Immunol Rev, 1982. 65:99-113.
145. Anderson MA, Bluestone J. *The NOD mouse: a model of immune dysregulation.* Annu Rev Immunol, 2005. 23:447-85.
146. Lund T, O'Reilly L, Hutchings P et al. *Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by transgenes encoding modified I-A beta-chain or I-E alpha-chain.* Nature, 1990. 21(6277):662-4.
147. Wicker LS, Todd JA, Peterson LB. *Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse.* Annu Rev Immunol, 1995. 13:179-200.
148. Carrillo J, Puertas MC, Alba A et al. *Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements.* Diabetes, 2005. 54(1):69-77.

149. Puertas MC, Carrillo J, Pastor X et al. *Peripherin is a relevant neuroendocrine autoantigen recognized by islet-infiltrating B lymphocytes*. J Immunol, 2007. 178(10):6533-9.
150. Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. *Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors*. Diabetes, 1993. 42(1):44-55.
151. Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway CA Jr. *CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells*. J Exp Med, 1996. 183(1):67-76.
152. Delovitch TL, Singh B. *The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD*. Immunity, 1997. 7(6):727-38.
153. Tsai S, Shameli A, Santamaria P. *CD8+ T cells in type 1 diabetes*. Adv Immunol, 2008. 100:79-124.
154. Emamaullee JA, Davis J, Merani S et al., *Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice*. Diabetes, 2009. 58(6):1302-11.
155. Gagnerault MC, Luan JJ, Lotton C, Lepault F. *Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice*. J Exp Med, 2002. 196(3):369-77.
156. Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WE, Finegood DT. *Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes?* Diabetes, 2000. 49(1):1-7.
157. Turley S, Poirot L, Hattori M, Benoist C, Mathis D. *Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model*. J Exp Med, 2003. 198(10):1527-37.
158. Li Q, Xu B, Michie SA, Rubins KH, Schreiber RD, McDevitt HO. *Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(34):12439-44.
159. O'Brien BA, Huang Y, Geng X, Dutz JP, Finegood DT. *Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced*. Diabetes, 2002. 51(8):2481-8.
160. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. *B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 1998. 161(8): p. 3912-8.
161. Greeley SA, Katsumata M, Yu L et al. *Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice*. Nat Med, 2002. 8(4):399-402.
162. Silveira PA, Grey ST. *B cells in the spotlight: innocent bystanders or major players in the pathogenesis of type 1 diabetes*. Trends Endocrin Met, 2006. 17(4):128-35.

163. Poirot L, Benoist C, Mathis D. *Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(21):8102-7.
164. Alba A, Planas R, Clemente X et al. *Natural killer cells are required for accelerated type 1 diabetes driven by interferon- β* . Clin Exp Immunol, 2008. 151:467-75.
165. Poulton LD, Smyth MJ, Hawke CG et al. *Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice*. Int Immunol, 2001. 13(7): p. 887-96.
166. Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H et al. *Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice*. Immunity, 2003. 18(1):41-51.
167. Kishimoto H, Sprent J. *A defect in central tolerance in NOD mice*. Nat Immunol, 2001. 2(11):1025-31.
168. Suri A, Levisetti SG, Unanue ER. *Do the peptide-binding properties of diabetogenic class II molecules explain autoreactivity?* Curr Opin Immunol, 2008. 20(1):105-10.
169. Tisch R, Wang B. *Dysregulation of T cell peripheral tolerance in type 1 diabetes*. Adv Immunol, 2008. 100:125-49.
170. Tang Q, Adams JY, Penaranda C et al. *Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction*. Immunity, 2008. 28(5):687-97.
171. Hong S, Wilson MT, Serizawa I et al. *The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice*. Nat Med, 2001. 7(9):1052-6.
172. Khadra A, Santamaria P, Edelstein-Keshet L. *The role of low avidity T cells in the protection against type 1 diabetes: a modeling investigation*. J Theor Biol, 2009. 256(1):126-41.
173. Cameron MJ, Arreaza GA, Grattan M et al. *Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes*. J Immunol, 2000. 165(2): p. 1102-10.
174. Rhode A, Pauza ME, Barral AM et al. *Islet-specific expression of CXCL10 causes spontaneous islet infiltration and accelerates diabetes development*. J Immunol, 2005. 175(6):3516-24.
175. Martin AP, Rankin S, Pitchford S, Charo IF, Furtado GC, Lira SA. *Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes*. Diabetes, 2008. 57(11): 3025-33.
176. Serreze DV, Prochazka M, Reifsnyder PC, Bridgett MM, Leiter EH. *Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene*. J Exp Med, 1994. 180(4):1553-8.

177. Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH. *The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(8):3290-4.
178. Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. *Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment and autoimmunity*. ILAR Journal, 2004. 45(3):278-291.
179. Wallis RH, Wang K, Marandi L et al. *Type 1 diabetes in the BB rat: a polygenic disease*. Diabetes, 2009. 58:1007-17.
180. Stewart TA, Hultgren B, Huang X, Pitts-Meek S, Hully J, MacLachlan NJ. *Induction of type I diabetes by interferon- α in transgenic mice*. Science, 1993. 260:1942-6.
181. Alba A, Puertas MC, Carrillo J et al. *IFN β accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to β cells in nondiabetes-prone mice*. J Immunol, 2004. 173:6667-75.
182. Vassileva G, Chen SC, Zeng M et al. *Expression of a novel murine type I IFN in the pancreatic islets induces diabetes in mice*. J Immunol, 2003. 170:5748-55
183. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. *Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(26):15623-8.
184. Bogdan C, Mattner J, Schleicher U. *The role of type I interferons in non-viral infections*. Immunol Rev, 2004. 202: 33-48.
185. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. *Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 307-36.
186. Pelegri M, Devedjian JC, Costa C et al. *Evidence from transgenic mice that interferon- β may be involved in the onset of diabetes mellitus*. J Biol Chem 1998. 273:123-12332-40.
187. Makino S, Tochino Y. *The spontaneously nonobese diabetic mouse*. Exp Anim, 1978. 27:27
188. Prochazka M, Serreze DV, Frankel WN, Leiter EH. *NOR/LTJ ej: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice*. Diabetes, 1992. 41:98-106.
189. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC et al., *Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays*. Nat Biotechnol, 1996. 14(13):1675-80.
190. Staal YC, van Herwijnen MH, van Schooten FJ, van Delft JH. *Application of four dyes in gene expression analyses by microarrays*. BMC Genomics, 2005. 6:101.
191. Hyatt G, Melamed R, Park R et al. *Gene expression microarrays: glimpses of the immunological genome*. Nat Immunol, 2006. 7(7):686-91.
192. Baechler EC, Batliwalla FM, Reed AM et al. *Gene expression profiling in human autoimmunity*. Immunol Rev, 2006. 210:120-37.

193. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G et al. *Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(5):2610-5.
194. Emamian ES, Leon JM, Lessard CJ et al. *Peripheral blood gene expression profiling in Sjogren's syndrome*. Genes Immun, 2009. 10(4):285-96.
195. Chaussabel D, Quinn C, Shen J et al. *A modular analysis framework for blood genomics studies: application to systemic lupus erythematosus*. Immunity, 2008. 29(1):150-64.
196. Maas K, Chan S, Parker J et al. *Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease*. J Immunol, 2002. 169(1):5-9.
197. Kaizer EC, Glaser CL, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, White PC. *Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. 92(9):3705-11.
198. Wang X, Jia S, Geoffrey R, Alemzadeh R, Ghosh S, Hessner MJ. *Identification of a molecular signature in human type 1 diabetes mellitus using serum and functional genomics*. J Immunol, 2008. 180(3):1929-37.
199. Padmos RC, Schloot NC, Beyan H et al. *Distinct monocyte gene-expression profiles in autoimmune diabetes*. Diabetes, 2008. 57(10):2768-73.
200. Oresic M, Simell S, Sysi-Aho M et al., *Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes*. J Exp Med, 2008. 205(13):2975-84.
201. Peterson KS, Huang JF, Zhu J et al. *Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli*. J Clin Invest, 2004. 113(12):1722-33.
202. Zhou X, Dimachkie MM, Xiong M, Tan FK, Arnett FC. *cDNA microarrays reveal distinct gene expression clusters in idiopathic inflammatory myopathies*. Med Sci Monit, 2004. 10(7):BR191-7.
203. Lock C, Hermans G, Pedotti R et al., *Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis*. Nat Med, 2002. 8(5):500-8.
204. Castellanos-Rubio A, Martin-Pagola A, Santín I et al. *Combined functional and positional gene information for the identification of susceptibility variants in celiac disease*. Gastroenterology, 2008. 134(3):738-46.
205. Vukkadapu SS, Belli JM, Ishii K, et al. *Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse*. Physiol Genomics, 2005. 21(2):201-11.
206. Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. *Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration?* Diabetologia, 2005. 48(11):2221-8.

207. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ et al., *International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation*. N Engl J Med, 2006. 355(13):1318-30.
208. D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S et al. *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2006. 24(11):1392-401.
209. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K et al. *Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo*. Nat Biotechnol, 2008. 26(4):443-52.
210. Akirav E, Kushner JA, Herold KC. *Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone?* Diabetes, 2008. 57(11):2883-8.
211. Nir T, Melton DA, Dor Y. *Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration*. J Clin Invest, 2007. 117(9):2553-61.
212. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation*. Nature, 2004. 429(6987):41-6.
213. Butler AE, Galasso R, Meier JJ, Basu R, Rizza RA, Butler PC. *Modestly increased beta cell apoptosis but no increased beta cell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis*. Diabetologia, 2007. 50(11):2323-31.
214. Meier JJ, Butler AE, Saisho Y et al. *Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans*. Diabetes, 2008. 57(6):1584-94.
215. Pittenger GL, Taylor-Fishwick D, Vinik AI. *A role for islet neogenesis in curing diabetes*. Diabetologia, 2009. 52(5):735-8.
216. Inada A, Nienaber C, Katsuta H et al. *Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(50):19915-9.
217. Suarez-Pinzon WL, Power RF, Yan Y, Wasserfall C, Atkinson M, Rabinovitch A. *Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin restores normoglycemia in diabetic NOD mice*. Diabetes, 2008. 57(12):3281-8.
218. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. *Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats*. Diabetes, 1999. 48(12):2270-6.
219. Suarez-Pinzon WL, Yan Y, Power R, Brand SJ, Rabinovitch A. *Combination therapy with epidermal growth factor and gastrin increases beta-cell mass and reverses hyperglycemia in diabetic NOD mice*. Diabetes, 2005. 54(9):2596-601.
220. Lipsett M, Hanley S, Castellarin M et al. *The role of islet neogenesis-associated protein (INGAP) in islet neogenesis*. Cell Biochem Biophys, 2007. 48(2-3):127-37.
221. Okamoto H. *The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 1999. 6(3):254-62.

222. Laurine E, Manival X, Montgelard C et al. *PAP IB, a new member of the Reg gene family: cloning, expression, structural properties, and evolution by gene duplication*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1727(3):177-87.
223. Terazono K, Uchiyama Y, Ide M et al. *Expression of reg protein in rat regenerating islets and its co-localization with insulin in the beta cell secretory granules*. *Diabetologia*, 1990. 33(4):250-2.
224. Graf R, Schiesser M, Reding T et al. *Exocrine meets endocrine: pancreatic stone protein and regenerating protein--two sides of the same coin*. *J Surg Res*, 2006. 133(2):113-20.
225. Unno M, Nata K, Noguchi N et al. *Production and characterization of Reg knockout mice: reduced proliferation of pancreatic beta-cells in Reg knockout mice*. *Diabetes*, 2002. 51 Suppl 3:S478-83.
226. Gross DJ, Weiss L, Reibstein I, et al. *Amelioration of diabetes in nonobese diabetic mice with advanced disease by linomide-induced immunoregulation combined with Reg protein treatment*. *Endocrinology*, 1998. 139(5):2369-74.
227. Rosenberg L, Lipsett M, Yoon JW et al. *A pentadecapeptide fragment of islet neogenesis-associated protein increases beta-cell mass and reverses diabetes in C57BL/6J mice*. *Ann Surg*, 2004. 240(5):875-84.
228. Guy-Crotte O, Amouric M, Figarella C. *Characterization and N-terminal sequence of a degradation product of 14,000 molecular weight isolated from human pancreatic juice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. 125(2):516-23.
229. Shervani NJ, Takasawa S, Uchigata Y et al. *Autoantibodies to REG, a beta-cell regeneration factor, in diabetic patients*. *Eur J Clin Invest*, 2004. 34(11):752-8.
230. Sanchez D, Figarella C, Marchand-Pinatel S, Bruneau N, Guy-Crotte O. *Preferential expression of reg I beta gene in human adult pancreas*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 284(3):729-37.
231. Narushima Y, Unno M, Nakagawara K et al. *Structure, chromosomal localization and expression of mouse genes encoding type III Reg, RegIII alpha, RegIII beta, RegIII gamma*. *Gene*, 1997. 185(2):159-68.
232. Gurr W, Shaw M, Li Y, Sherwin R. *RegII is a beta-cell protein and autoantigen in diabetes of NOD mice*. *Diabetes*, 2007. 56(1):34-40.
233. Gironella M, Iovanna JL, Sans M et al. *Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease*. *Gut*, 2005. 54(9):1244-53.
234. Gurr W, Yavari R, Wen L et al. *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*, 2002. 51(2):339-46.
235. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV et al. *Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin*. *Science*, 2006. 313(5790):1126-30.
236. Nata K, Liu Y, Xu L et al. *Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a novel human REG family gene, REG III*. *Gene*, 2004. 340(1):61-70.

237. Norkina O, Graf R, Appenzeller P, De Lisle RC. *Caerulein-induced acute pancreatitis in mice that constitutively overexpress Reg/PAP genes*. BMC Gastroenterol, 2006. 6:16.
238. Abe M, Nata K, Akiyama T et al. *Identification of a novel Reg family gene, Reg IIIdelta, and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region*. Gene, 2000. 246(1-2):111-22.
239. Keilbaugh SA, Shin ME, Banchereau RF et al. *Activation of RegIIIbeta/gamma and interferon gamma expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonisation of the gut*. Gut, 2005. 54(5):623-9.
240. Hartupée JC, Zhang H, Bonaldo MF, Soares MB, Dieckgraefe BK. *Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV*. Biochim Biophys Acta, 2001. 1518(3):287-93.
241. Gu Z, Rubin MA, Yang Y et al. *Reg IV: a promising marker of hormone refractory metastatic prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2005. 11(6):2237-43.
242. Schröder N, Sekhar A, Geffers I et al. *Identification of mouse genes with highly specific expression patterns in differentiated intestinal epithelium*. Gastroenterology, 2006. 130(3):902-7.
243. Kobayashi S, Akiyama T, Nata K et al. *Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor*. J Biol Chem, 2000. 275(15):10723-6.
244. Takasawa S, Ikeda T, Akiyama T et al. *Cyclin D1 activation through ATF-2 in Reg-induced pancreatic beta-cell regeneration*. FEBS Lett, 2006. 580(2):585-91.
245. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S et al. *Possible role of REG Ialpha protein in ulcerative colitis and colitic cancer*. Gut, 2005. 54(10):1437-44.
246. Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. *MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal Listeria monocytogenes infection*. J Exp Med, 2007. 204(8):1891-900.
247. Stevens AM. *Do maternal cells trigger or perpetuate autoimmune diseases in children?* Pediatr Rheumatol Online J, 2007. 5:9.
248. Klonisch T, Drouin R. *Fetal-maternal exchange of multipotent stem/progenitor cells: microchimerism in diagnosis and disease*. Trends Mol Med, 2009. 15(11):510-8.8.
249. Pollack MS, Kirkpatrick D, Kapoor N, Dupont B, O'Reilly RJ. *Identification by HLA typing of intrauterine-derived maternal T cells in four patients with severe combined immunodeficiency*. N Engl J Med, 1982. 307(11):662-6.
250. Thompson LF, O'Connor RD, Bastian JF. *Phenotype and function of engrafted maternal T cells in patients with severe combined immunodeficiency*. J Immunol, 1984. 133(5):2513-17.
251. Knobloch C, Goldmann SF, Friedrich W. *Limited cell receptor diversity of transplacentally acquired maternal T cells in severe combined immunodeficiency*. J Immunol, 1991. 146:4157-64.

252. Maloney S, Smith A, Furst DE. *Microchimerism of maternal origin persists into adult life.* J Clin Invest, 1999. 104:41-7.
253. Mold JE, M.J., Burt TD et al., *Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero.* Science, 2008. 322:1562-65.
254. Stevens AM. *Do maternal cells trigger or perpetuate autoimmune diseases in children?* Pediatr Rheumatol Online J, 2007. 5:9.
255. Nelson JL, *Your cells are my cells.* Sci Am, 2008. 298(2):64-71.
256. Stevens, A.M., et al., *Maternal and sibling microchimerism in twins and triplets discordant for neonatal lupus syndrome-congenital heart block.* Rheumatology (Oxford), 2005. 44(2):187-91.
257. Zhou L, Yoshimura Y, Huang YY et al. *Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth.* Immunology, 2000. 101:570-581.
258. Gleicher N, Barad DH. *Gender risk as factor for autoimmune diseases.* J Autoimmun, 2007. 28:1-6.
259. Stevens AM, Hermes HM, Rutledge JC, Buyon JP, Nelson JL. *Myocardial-tissue-specific phenotype of maternal microchimerism in neonatal lupus congenital heart block.* Lancet, 2003. 362(9396):1617-23.
260. Reed AM, McNallan K, Wettstein P, Vehe R, Ober C. *Does HLA-dependent chimerism underlie the pathogenesis of juvenile dermatomyositis?* J Immunol, 2004. 172:5041-46.
261. Lambert NC, Pang JM, Yan Z et al. *Quantification of maternal microchimerism by HLA-specific real-time polymerase chain reaction.* Arth Rheum, 2004. 50(3):906-914.
262. McNallan KT, Aponte C, el-Azhary R et al. *Immunophenotyping of chimeric cells in localized scleroderma.* Rheumatology, 2007. 46:398-402.
263. Khosrotehrani K, Guegan S, Fraitag S et al. *Presence of chimeric maternally derived keratinocytes in cutaneous inflammatory diseases of children: the example of pityriasis lichenoides.* J Invest Dermatol, 2006. 126(2): p. 345-8.
264. Nelson JL, Gillespie KM, Lambert NC et al. *Maternal microchimerism in peripheral blood in type 1 diabetes and pancreatic islet beta cell microchimerism.* Proc Natl Acad Sci USA, 2006. 104(5):1637-42.
265. Tanaka A, Lindor K, Gish R et al. *Fetal microchimerism alone does not contribute to the induction of primary biliary cirrhosis.* Hepatology, 1999. 30(4):833-8.
266. Corpechot C, Barbu V, Chazouillères O, Poupon R. *Fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis.* J Hepatol, 2000. 33(5):696-700.
267. Kremer Hovinga IC, Koopmans M, Baelde HJ et al. *Tissue chimerism in systemic lupus erythematosus is related to injury.* Ann Rheum Dis, 2007. 66(12):1568-73.
268. Renné C, Ramos Lopez E, Steimle-Grauer SA et al. *Thyroid fetal male microchimerisms in mothers with thyroid disorders: presence of Y-chromosomal immunofluorescence in*

- thyroid-infiltrating lymphocytes is more prevalent in Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease than in follicular adenomas.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(11):5810-4.
269. Johnson KL, McAlindon TE, Mulcahy E, Bianchi DW. *Fetal cell microchimerism in tissue from multiple sites in women with systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 2001. 44(8):1848-54.
270. Ohtsuka T, Miyamoto Y, Yamakage A, Yamazaki S. *Quantitative analysis of microchimerism in systemic sclerosis skin tissue.* Arch Dermatol Res, 2001. 293(8):387-91.
271. Khosrotehrani K, Leduc M, Bachy V et al. *Pregnancy allows the transfer and differentiation of fetal lymphoid progenitors into functional T and B cells in mothers.* J Immunol, 2007. 180:889-97.
272. Hamaguchi K, Gaskins HR, Leiter EH. *NIT-1, a pancreatic beta-cell line established from a transgenic NOD/Lt mouse.* Diabetes, 1991. 40(7):842-9.
273. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. *Automated method for isolation of human pancreatic islets.* Diabetes, 1988. 37(4):413-20.
274. Vargas F, Vives-Pi, Somoza N et al. *Advantages of using a cell separator and metrizamide gradients for human islet purification.* Transplantation, 1996. 61(11):1562-6.
275. Smyth GK. *Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments.* Stat Appl Genet Mol Biol, 2004. 3:Article3.
276. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.* Genome Biol, 2002. 3(7):RESEARCH0034.
277. Sabater L et al. *Insulin alleles and autoimmune regulator (AIRE) gene expression both influence insulin expression in the thymus.* J Autoimmun, 2005. 25(4):312-8.
278. Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method.* Methods, 2001. 25(4):402-8.
279. In't Veld P, Lievens D, De Grijse J et al. *Screening for insulinitis in adult autoantibody-positive organ donors.* Diabetes, 2007. 56(9):2400-4.
280. Ylipaasto P, Kutlu B, Rasilainen S et al. *Global profile of coxsackievirus- and cytokine-induced expression in human pancreatic islets.* Diabetologia, 2005. 48: p. 1510-1522.
281. Abdul-Rasoul M, Habib H, Al-Khouly M. *'The honeymoon phase' in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors.* Pediatr Diabetes, 2006. 7(2):101-7.
282. Aly H, and Gottlieb P. *The honeymoon phase: intersection of metabolism and immunology.* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009. 16(4):286-92.
283. Viken MK, Blomhoff A, Olsson M et al. *Reproducible association with type 1 diabetes in the extended class I region of the major histocompatibility complex.* Genes Immun, 2009. 10(4): p. 323-33.

284. Gommeaux J, Grégoire C, Nguessan P et al. *Thymus-specific serine protease regulates positive selection of a subset of CD4+ thymocytes*. Eur J Immunol, 2009. 39(4):956-64.
285. Calderon B, Suri A, Miller MJ, Unanue ER. *Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(16):6121-6.
286. Park WD, Stegall MD. *A meta-analysis of kidney microarray datasets: investigation of cytokine gene detection and correlation with rt-PCR and detection thresholds*. BMC Genomics, 2007. 8:88.
287. Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS et al. *B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice*. J Exp Med, 1996. 184(5):2049-53.
288. Xiu Y, Wong CP, Bouaziz JD et al. *B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions*. J Immunol, 2008. 180(5):2863-75.
289. Kendall PL, Yu G, Woodward EJ, Thomas JW. *Tertiary lymphoid structures in the pancreas promote selection of B lymphocytes in autoimmune diabetes*. J Immunol, 2007. 178(9):5643-51.
290. Aloisi F, Pujol-Borrell R. *Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(3):205-17.
291. Mackay F, Schneider P. *Cracking the BAFF code*. Nat Rev Immunol, 2009. 9(7):491-502.
292. Rabinovitch, A. *An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabetes Metab Rev, 1998. 14(2):129-51.
293. Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-Polagruto J, Miguelino E, Jialal I. *Increased monocyte activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes*. Diabetes, 2006. 55(3):774-9.
294. Morgan BP, Gasque P. *Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why?* Clin Exp Immunol, 1997. 107(1):1-7.
295. Gasque P. *Complement: a unique innate immune sensor for danger signals*. Mol Immunol, 2004. 41(11):1089-98.
296. Jozsi M, Zipfel PF. *Factor H family proteins and human diseases*. Trends Immunol, 2008. 29(8):380-7.
297. Meri S. *Loss of self-control in the complement system and innate autoreactivity*. Ann N Y Acad Sci, 2007. 1109:93-105.
298. Elshebani A, Olsson A, Westman J, Tuvemo T, Korsgren O, Frisk G. *Effects on isolated human pancreatic islet cells after infection with strains of enterovirus isolated at clinical presentation of type 1 diabetes*. Virus Res, 2007. 124(1-2):193-203.
299. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. *The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes*. Nat Rev Endocrinol, 2009. 5(4):219-26.

300. Jabs WJ, Lögering BA, Gerke P et al. *The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo*. Eur J Immunol, 2003. 33(1):152-61.
301. Black S, Kushner I, Samols D. *C-reactive Protein*. J Biol Chem, 2004. 279(47):48487-90.
302. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. *S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules*. J Leukoc Biol, 2007. 81(1):28-37.
303. Rock KL, Kono H. *The inflammatory response to cell death*. Annu Rev Pathol, 2008. 3:99-126.
304. Abulafia-Lapid R, Gillis D, Yosef O, Atlan H, Cohen IR. *T cells and autoantibodies to human HSP70 in type 1 diabetes in children*. J Autoimmun, 2003. 20(4):313-21.
305. Millar DG, Garza KM, Odermatt B, Elford AR, Ono N, Li Z, Ohashi PS. *Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo*. Nat Med, 2003. 9(12): p. 1469-76.
306. Rossi D, Zlotnik A. *The biology of chemokines and their receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. 18:217-42.
307. Pène J, Chevalier S, Preisser L et al. *Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes*. J Immunol, 2008. 180(11):7423-30.
308. Kolls JK, Linden A. *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. 21(4):467-76.
309. Carlson T, Kroenke M, Rao P, Lane TE, Segal B. *The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease*. J Exp Med, 2008. 205(4):811-23.
310. Zrioual, S., et al., *IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR+ CXC chemokine expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood*. J Immunol, 2008. 180(1): p. 655-63.
311. Movahedi B, Gysemans C, Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, Mathieu C, Pipeleers D. *Pancreatic duct cells in human islet cell preparations are a source of angiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothelial growth factor*. Diabetes, 2008. 57(8):2128-36.
312. Lozanoska-Ochser B, Peakman M. *Level of major histocompatibility complex class I expression on endothelium in non-obese diabetic mice influences CD8 T cell adhesion and migration*. Clin Exp Immunol, 2009. 157(1):119-27.
313. Lozanoska-Ochser B, Klein NJ, Huang GC, Alvarez RA, Peakman M. *Expression of CD86 on human islet endothelial cells facilitates T cell adhesion and migration*. J Immunol, 2008. 181(9):6109-16.
314. Silverstein RL, Febbraio M. *CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior*. Sci Signal, 2009. 2(72):re3.
315. von Herrath MG, Sanda S, Herold K. *Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease?* Nat Rev Immunol, 2007. 7(12):988-94.

316. Zang X, Allison JP. *To be or not to be B7*. J Clin Invest, 2006. 116(10):2590-3.
317. Ristich, V., et al., *Tolerization of dendritic cells by HLA-G*. Eur J Immunol, 2005. 35(4): p. 1133-42.
318. Cirulli V, Zalatan J, McMaster M et al. *The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G*. Diabetes, 2006. 55(5):1214-22.
319. Hoare HL, Sullivan LC, Pietra G et al. *Structural basis for a major histocompatibility complex class Ib-restricted T cell response*. Nat Immunol, 2006. 7(3):256-64.
320. Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J. *Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule*. Blood, 2008. 111(10): p. 4862-70.
321. Shiroishi, M., et al., *Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(15):8856-61.
322. Aboumrad E, Madec AM, Thivolet C. *The CXCR4/CXCL12 (SDF-1) signalling pathway protects non-obese diabetic mouse from autoimmune diabetes*. Clin Exp Immunol, 2007. 148(3):432-9.
323. Sharp CD, Huang M, Glawe J, Patrick DR, Pardue S, Barlow SC, Kevil CG. *Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 stimulates chemorepulsion of NOD/LtJ T-cell adhesion to islet microvascular endothelium*. Diabetes, 2008. 57(1):102-12.
324. Liu EH, Digon BJ 3rd, Hirshberg B et al. *Pancreatic beta cell function persists in many patients with chronic type 1 diabetes, but is not dramatically improved by prolonged immunosuppression and euglycaemia from a beta cell allograft*. Diabetologia, 2009. 52(7):1369-80.
325. Ekblad E, Sundler F. *Distribution of pancreatic polypeptide and peptide YY*. Peptides, 2002. 23(2):251-61.
326. Creutzfeldt W, Gleichmann D, Otto J, Stöckmann F, Maisonneuve P, Lankisch PG. *Follow-up of exocrine pancreatic function in type-1 diabetes mellitus*. Digestion, 2005. 72(2-3):71-5.
327. Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M et al. *High prevalence of autoantibodies against carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes: concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas*. Pancreas, 2003. 27(1):26-30.
328. Riesle E, Friess H, Zhao L et al. *Increased expression of transforming growth factor beta s after acute oedematous pancreatitis in rats suggests a role in pancreatic repair*. Gut, 1997. 40(1): p. 73-9.
329. Nielsen JH, Galsgaard ED, Møldrup A et al. *Regulation of beta-cell mass by hormones and growth factors*. Diabetes, 2001. 50 Suppl 1:S25-9.
330. Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S et al. *A novel gene activated in regenerating islets*. J Biol Chem, 1988. 263(5):2111-4.

331. Li L, He Q, Garland A et al. *Beta cell-specific CD4+ T cell clonotypes in peripheral blood and the pancreatic islets are distinct.* J Immunol, 2009. 183(11):7585-91.
332. Aspod C, Rome S, Thivolet C. *Early events in islets and pancreatic lymph nodes in autoimmune diabetes.* J Autoimmun, 2004. 23(1):27-35.
333. Hjelmervik TO, Petersen K, Jonassen I, Jonsson R, Bolstad AI. *Gene expression profiling of minor salivary glands clearly distinguishes primary Sjogren's syndrome patients from healthy control subjects.* Arthritis Rheum, 2005. 52(5):1534-44.
334. van der Pouw Kraan TC, van Gaalen FA, Huizinga TW, Pieterman E, Breedveld FC, Verweij CL. *Discovery of distinctive gene expression profiles in rheumatoid synovium using cDNA microarray technology: evidence for the existence of multiple pathways of tissue destruction and repair.* Genes Immun, 2003. 4(3):187-96.
335. Aust G, Krohn K, Morgenthaler NG. *Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis in monozygotic twins: case study as well as transcriptomic and immunohistological analysis of thyroid tissues.* Eur J Endocrinol, 2006. 154(1):13-20.
336. Zhou X, Krueger JG, Kao MC et al. *Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array.* Physiol Genomics, 2003. 13(1):69-78.
337. Atkinson MA, Gianani R. *The pancreas in human type 1 diabetes: providing new answers to age-old questions.* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2009. 16(4):279-85.
338. Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, Samura O, Lee SL, Bianchi DW. *Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study.* Lancet, 2001. 358(9298):2034-8.
339. Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD et al. *Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero.* Science, 2008. 322(5907):1562-5.
340. Burlingham WJ. *A lesson in tolerance--maternal instruction to fetal cells.* N Engl J Med, 2009. 360(13):1355-7.
341. Dutta P, Molitor-Dart M, Bobadilla JL et al. *Microchimerism is strongly correlated with tolerance to noninherited maternal antigens in mice.* Blood, 2009. 114(17):3578-87.
342. vanZyl B, Gillespie KM. *Microchimerism in type 1 diabetes.* Curr Diab Rep, 2009. 9(2):125-9.
343. Kucia M, Jankowski K, Reza R et al. *CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion.* J Mol Histol, 2004. 35(3):233-45.
344. Kayali AG, Van Gunst K, Campbell IL et al., *The stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 ligand-receptor axis is critical for progenitor survival and migration in the pancreas.* J Cell Biol, 2003. 163(4):859-69.
345. Hathout EH, Hartwick N, Fagoaga OR et al. *Clinical, autoimmune, and HLA characteristics of children diagnosed with type 1 diabetes before 5 years of age.* Pediatrics, 2003. 111(4 Pt 1):860-3.

346. Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK et al. *Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes.* J Immunol, 1999. 162(5):2511-20.
347. Christen U, von Herrath MG. *IP-10 and type 1 diabetes: a question of time and location.* Autoimmunity, 2004. 37(5):273-82.
348. Frigerio S, Junt T, Lu B et al. *Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis.* Nat Med, 2002. 8(12):1414-20.
349. Kim MO, Suh HS, Brosnan CF, Lee SC. *Regulation of RANTES/CCL5 expression in human astrocytes by interleukin-1 and interferon-beta.* J Neurochem, 2004. 90(2):297-308.
350. Taub DD, Sayers TJ, Carter CR, Ortaldo JR. *Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity.* J Immunol, 1995. 155(8):3877-88.
351. Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhou Z, Zhang J, Tian Z. *Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D.* Hum Immunol, 2008. 69(8):490-500.
352. Duluc D, Tan F, Scotet M et al. *PolyI:C plus IL-2 or IL-12 induce IFN-gamma production by human NK cells via autocrine IFN-beta.* Eur J Immunol, 2009. 39(10):2877-84.
353. Feuerer M, Shen Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. *How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets.* Immunity, 2009. 31(4):654-64.
354. Campbell IL, Hobbs MV, Dockter J, Oldstone MB, Allison J. *Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice.* Am J Pathol, 1994. 145(1):157-66.
355. Gu D, Sarvetnick N. *Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN-g transgenic mice.* Development, 1993. 118(1):33-46.
356. Rosmalen JG, Leenen PJ, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-Delarche F. *Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes.* Trends Endocrinol Metab, 2002. 13(5):209-14.

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Investigar no és fàcil, i el temps d'una tesi dóna per molt: reptes, entrebancs... i recompenses que et fan sentir que això que fas val la pena. Tots vosaltres hi heu contribuït i ara m'arriba l'ocasió de donar-vos-en les gràcies:

A la Marta, per obrir-me les portes del teu grup i de la recerca. Per ensenyar-me que darrera de la frase *type 1 diabetes is an autoimmune disease* hi havia tot un món. Per les discussions científiques que m'han fet aprendre un munt. La paciència i comprensió quan no hi ha manera que les coses surtin. Per permetre'm implicar-me en els projectes, aportar i aplicar idees. I pel més personal, per encomanar-me positivitat, calidesa i fer-me tirar endavant en moments durs, el sentit de l'humor (*se va abé un follón...*) i la motivació que m'has transmès dia a dia.

Al Joan, gràcies per integrar-me al grup dels *Ratolins*. Per la teva fe en el que fas, els ànims i consells del dia a dia i sobre el futur. I per convèncer-nos quan cal de que en aquest "país de pandereta"... nosaltres també "farem grans coses"!!

A Ricardo, por permitirme realizar la Tesis Doctoral en el LIRAD y empezar a investigar en inmunología. Por los consejos y aportaciones científicas y seguir manteniendo el empeño para averiguar los porqués sobre la diabetes tipo 1.

Als meus companys del grup dels *ratolins*. Gràcies sobretot per la vostra amistat. Sou un exemple de treball en equip i companyerisme per superar situacions difícils o inesperades... que tots tenim en ment moments surrealistes viscuts a l'estabulari!, i en aquell Lab3-tetris superpoblat on vaig aprendre molt i riure més. A cadascun de vosaltres us vull d'agraïr coses: a l'Auro, gràcies per la bona acollida i tot el que vaig aprendre de tu del laboratori, temes *ratonils* i extralaborals. Treballar amb tu era fàcil i mai avorrit perquè estàs *fatal del calamar*. Per les hores de viatge en cotxe compartides cap al Vallès, i perquè encara que ja no som "germanes científiques" seguim sent amigues. A Jorge, por implicarte en aportar cuanto puedes en el trabajo de los demás. Por nuestras discusiones científicas (que echo de menos!). Por tu sencillez, honestidad y sentido del humor Denominación de Origen Priego de Córdoba, trabajando a tu lado es difícil tener un mal día!! A la Mari Carmen, una companya organitzada i pràctica al lab, i una amiga propera dins i fora d'aquest. Per la teva empatia, preocupant-te sempre per saber com està una, científicament i personal. Al Xavi, per fer-me riure en moments de crisi, pels "miracles" i els viatges, i per demostrar valentia tornant a començar fins a trobar el teu lloc, ... crec que ja l'has trobat!! A la Rosa, per tota la feinada que fas tenint cura dels ratolins, que no és pas poca! Però sobretot per preocupar-te per mi i saber que una pot comptar sempre amb tu... i amb la teva família: gràcies també al Juan (per l'assessorament

informàtic), la Bego, i al petit Guillem!!, amb vosaltres també he viscut mil bones estones durant aquests anys! A les meves companyes dels últims temps: la Sílvia i l'Írma. Gràcies per ser tant bones companyes! Per la vostra senzillesa com a persones i les ganes que hi poseu en la feina. Per preocupar-vos i ajudar-me sempre que podeu... i pels esmorzars i berenars compartits que fan passar el dia més ràpid! Al Xavi Clemente, demostrant el teu entusiasme per la ciència i la capacitat de lluita per aconseguir el que desitges –lluita contra el temps gèlid de Calgary si fa falta-. A Jorge Carrascal, mi vecino de poyata y mesa, por tu ayuda y compañerismo durante estos últimos años. I a la Berta, l'últim fitxatge dels ratolins, per les ganes i l'esperit d'adaptació.

Als dendrítics. A la Mar, per la fortalesa i positivitat que transmetes, les converses després de guardar les dendrítiques a l'incubador i apagar la campana, els moments compartits en congressos, París i una llaaarga nit de cua per aconseguir unes entrades. A la Bego, per l'empenta que demostres. A la Dàlia, pels teus ànims i empatia i pels tès a mitges. A la Patri i la Laia. I al Francesc, per l'ajut en els moments de crisi informàtiques, bons consells i ànims transmesos.

A Marta Ruiz, mi compañera de locura provocada por el *Síndrome-de-los-Genes*!! ¿será transitoria? Gracias por tu apoyo y complicidad y por esas risas que se contagian! A l'Eduarne, pels cafès compartits i els ànims. Al Roger, la Rosa i la Pilar, pels consells pràctics i anècdotes viscudes aquests anys.

Als companys d'assistencial, pels moments compartits i per aportar un toc d'alegria al laboratori: a l'Estíbaliz, Iñaki, Aina, Ana, Virgínia. A l'Olga, Sílvia, Pepi, Albert, Àlex, Amanda, Eva Campos, Justí, Laura, Cristina, Aroa, Bea, Ma. Jesús. A la Yolanda, per la teva amabilitat i l'ajuda en temes burocràtics. I per resistir estoicament quan portem pastes al laboratori i te les deixem tot el dia a la teva taula, si és que som cruels... A la Marga, per la teva capacitat per portar mil coses ahora perquè el lab rutlli, i a més fer-ho amb alegria i bon humor! Per cuidar-nos a tots una mica.

A María José, por las english-sessions compartidas y tu tarea en la organización de seminarios. ¿A que ésto último no lo echas de menos? ...tienes una buena causa! Por echarme una mano profesional y personalmente cuando lo he necesitado. A Eva Martínez, por los consejos y ánimos transmitidos durante estos años. A l'Eduard per la teva amabilitat i ajuda i per resoldre'm algun dubte sobre el món abstracte de l'HLA.

Al Manel, per estar sempre disposat a ajudar, pels bons consells i per mostrar-te proper, estiguis o no al final del passadís. A d'altres companys que vau deixar el laboratori: Cristina, Kolko, Lídia, Patrícia Castro, Fran, etc., pel temps compartit.

Al Marco, per la teva paciència sempre que et demanem ajuda i pels consells en citometria. A la gent de la UTE, per ajudar quan fa falta, pel vostre bon humor i per preocupar-vos de tant en tant per com ens van les coses als "veïns de dalt". A la gent dels grups de l'ICO, Digestiu, Neuro i de la resta de grups de l'Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol que heu contribuït al nostre treball amb consells, aportacions tècniques i reactius deixats. A Marga, per cuidar del estabulario.

A d'altres grups de l'hospital amb els quals hem col.laborat: el grup del Miquel Tarón per la vostra ajuda amb les qPCRs. A la Maite Fernández d'Anatomia Patològica, per la col.laboració en la detecció de neutròfils en pàncrees. A José Balibrea, per la ajuda en la recolecció de muestras, i la gent del Servei d'Endocrinologia.

Al grup d'Immunologia de la UAB: a la Dolores Jaraquemada i el seu grup, especialment a la Mercè Martí i l'Eva Codina per la vostra col.laboració i amabilitat.

A la Fátima Núñez, del Servei de Microarrays de la Vall d'Hebron, l'Anna Barceló, del Servei de Microarrays de la UAB i al Lauro Sumoy del Centre de Regulació Genòmica, per la vostra col.laboració amb el processament de microarrays. A l'Àlex Sánchez i la Carmen Ruiz de Villa, del Servei d'Estadística de la Universitat de Barcelona, per la vostra col.laboració en l'estadística dels microarrays. Gràcies a vosaltres hem aconseguit entendre alguna cosa d'aquest jeroglífic!

A les famílies dels donants, per la seva solidaritat i compromís en un moment especialment difícil.

Thanks to Kathleen Gillespie for your collaboration in the study of microchimerism, allowing me to work for 2 months with your group at Southmead Hospital in Bristol. Thanks Dine for working together with me, for your useful advices on FISH and for your kindness. And also thanks to Kay, Anna, Saba, Jo, Kayla and the rest of the team for being so welcoming with me during my stay in Bristol.

Als meus amics de la universitat, pels vostres ànims, que ja sabeu el pa que s'hi dóna amb la recerca... Per tots aquests anys d'amistat, soparets, calçotades i moments compartits.

A l'Aurora, per creure en mi.

A la Mireia i la Núria, a la Gema. A la gent d'Arenys i la resta d'amics, per la vostra amistat i suport moral!

I per acabar, a la meva família. A la meva tieta Lola, el meu cosí Salvador, el meu oncle Josep (on siguis) i la resta de familiars, gràcies pels vostres ànims i recolzament! I sobretot gràcies als meus pares i germanes. Vosaltres sou realment qui hi ha estat des del principi fins al final tant per celebrar les alegries com per esmorteir els cops. A les meves germanes, la Mariàngels i la Glòria. A l'Ignasi, al David i la petita Laia que arribarà aviat! Gràcies pels vostres ànims, consells i la vostra comprensió. I als meus pares, pels esforços fets per la nostra educació, una paciència que mai s'acaba i per fer-me costat sempre. Perquè sense vosaltres sí que això no seria possible!

Mil gràcies a tots!!

