

HIPEREXPRESSIÓ DE PROTEÏNES DE L'MHC EN ILLOTS PANCREÀTICS: RELACIÓ ENTRE CITOCINES, VIRUS, TRENCAMENT DE LA TOLERÀNCIA I DIABETIS MELLITUS TIPUS I?

MARTA VIVES-PI, NÚRIA SOMOZA, FRANCESCA VARGAS, PILAR ARMENGOL
I RICARD PUJOL-BORRELL

Unitat d'Immunologia. Hospital Germans Trias i Pujol. Universitat Autònoma de Barcelona. Badalona.

RESUM

La diabetis *mellitus* insulíndependent (IDDM) és una malaltia autoimmunitària causada per la destrucció selectiva de les cèl·lules β . Tant el mecanisme de la resposta autoimmunitària com el procés destructiu són, fins al moment, desconeguts. Un factor que ha dificultat l'estudi en aquest camp és la dificultat en l'obtenció de teixit pancreàtic dels pacients d'IDDM de recent diagnòstic. Revisarem a continuació els resultats de l'estudi d'uns pocs pàncrees humans —alguns fixats i d'altres congelats— obtinguts de pacients diabètics, aprofundint en l'estudi de l'expressió de HLA i altres molècules (molècules d'adhesió, citoquines) l'expressió aberrant de les quals ha estat primordial en l'establiment d'una hipòtesi de l'autoimmunitat endocrina. A la major part dels pàncrees diabètics estudiats, els illots que presenten insulitis mostren una hiperexpressió de HLA de classe I i —ocasionalment segons la nostra pròpia experiència— expressió ectòpica de classe II. La hiperexpressió de HLA de classe I i d'IFN- α ha estat detectada en alguns illots no afectats amb cèl·lules β remanents. En un dels casos, altres citoquines inflamatòries com ara IFN- β i IL-6, però no IL-1 o TNF- α , van ser detectades per RT-PCR.

Es sospita que els virus podrien ser els responsables d'aquests canvis que desencadenarien la IDDM; d'altra banda, i malgrat els extensius estudis epidemiològics, serològics i experimentals, no ha estat possible demostrar una connexió entre un virus determinat i la IDDM de la mateixa manera que no ha estat possible demostrar productes vírics als illots pancreàtics d'afectats d'IDDM. Fins al moment present, el mecanisme pel qual els virus poden induir autoimmunitat roman poc clar. L'escassa quantitat de teixit humà per a l'estudi de la IDDM ha desencadenat l'ús intensiu dels models animals, com és el cas de ratolí NOD, la rata BB i, més recentment, els ratolins transgènics generats utilitzant el promotor de la insulina per dirigir l'expressió de productes de MHC, citoquines i proteïnes virals a la cèl·lula β . Aquests experiments han modificat algunes de les idees sobre tolerància perifèrica, però no han aclarit quina pot ser la causa de la destrucció de la cèl·lula β . L'estudi de l'expressió de MHC a les cèl·lules β utilitzant ratolins transgènics no ha resolt la qüestió de si l'expressió aberrant de classe II és un fenomen primari o secundari.

MOTS CLAU: *MHC, diabetis mellitus tipus I, illots pancreàtics, cèl·lula β .*

SUMMARY

Insulin dependent diabetes *mellitus* (IDDM) is an autoimmune disease caused by the selective destruction of β cells. Neither the trigger of the autoimmune response, nor the destruction mechanism are known. One factor which has hindered research in this area is the difficulty in obtaining pancreatic tissue from newly diagnosed diabetic patients. We review here the results from the study of a few human pancreases—some fix, some frozen— from diabetic patients with special emphasis on HLA and other molecules (cell adhesion molecules, cytokines) whose «aberrant» or altered expression in the islets has become central to one of the hypothesis on endocrine autoimmunity. In most of the diabetic pancreases studied islets with insulinitis showed overexpression of HLA class I and—occasionally in our experience— ectopic expression of class II. Class I hyperexpression and IFN- α have been detected in some remaining unaffected insulin containing islets. In one case other inflammatory cytokines i.e. IFN- β i IL-6, but not IL-1 or TNF- α , were detected by RT-PCR.

Viruses are under suspicion to be responsible for causing these changes and triggering IDDM; However and in spite of extensive epidemiological, serological and experimental studies, it has not been possible to demonstrate a firm connection between a given virus and IDDM nor has it been possible to show viral products in the pancreatic islets of the IDDM pancreases. Until this moment, the mechanism by which viruses could induce autoimmunity remains therefore unclear. The shortage of human tissue to study IDDM has lead to intensive use of animal models i.e. the NOD mice, the BB rat and, more recently, the transgenic mice generated using the insulin promoter to direct β cell specific expression of MHC products, cytokines and viral proteins. These experiments have changed some of the prevailing ideas on peripheral tolerance but they have not clarified what could be the cause of β cell destruction. The study of the expression of MHC on β cells using transgenic mice has not clarified whether the «aberrant» expression of class II in IDDM is a primary or secondary phenomenon.

KEY WORDS: *MHC, Type 1 Diabetes mellitus, pancreatic islets, β cell.*

INTRODUCCIÓ

L'expressió de l'MHC a les cèl·lules pancreàtiques insulars ha estat estudiada a fons perquè són la diana de la resposta destructiva autoimmunitària que condueix a la diabetis tipus I i també en treballs de tolerància perifèrica amb ratolins transgènics. Diferents estudis van donar lloc a la hipòtesi de l'expressió aberrant de classe II a l'autoimmunitat endocrina (Bottazzo, 1983).

La hipòtesi de l'expressió aberrant de classe II EN l'autoimmunitat endocrina

L'expressió aberrant o ectòpica de molècules de HLA de classe II per part de cèl·lules que normalment no n'expressen va ser detectada per primer cop en les cèl·lules fol·liculars tiroïdals de pacients de tirotoxicosi autoimmunitària

(malaltia de Graves) (Hanafusa, 1983). Aquest descobriment, juntament amb la demostració d'inducibilitat *in vitro* de HLA de classe II a les cèl·lules fol·liculars (Pujol-Borrell, 1983), va fer postular la hipòtesi (Bottazzo, 1986): la manca de resposta immunitària activa contra les cèl·lules endocrines i altres cèl·lules diferenciades de teixits perifèrics, és deguda a la seva baixa expressió de molècules de HLA; això les fa invisibles als limfòcits T (silenci immunològic). La hipòtesi proposa que l'expressió de molècules de HLA de classe II per part de les cèl·lules endocrines pot portar a una presentació efectiva dels mateixos autoantígens a les cèl·lules T CD4+. Aquesta interacció pot tenir un paper principal en la conducció i el manteniment de la resposta autoimmunitària. Aquest model requereix, però, un factor iniciador capaç de provocar l'alliberament local de limfoquines reponsables de la inducció transitòria de molècules de classe II per part de les cèl·lules

endocrines i per atraure les cèl·lules T, entre les quals n'hi podria haver d'autoreactives que poguessin reconèixer les cèl·lules endocrines que presenten classe II quan inicien el curs cap a la malaltia (Pujol-Borrell, 1987a).

El descobriment de l'expressió ectòpica de classe II a la tiroide va portar a posteriors troballes d'expressió de classe II en altres malalties autoimmunitàries (Pujol-Borrell, 1987a). Un exemple d'aquestes malalties és la diabetis tipus I, on el procés destructiu es limita a un sol tipus cel·lular. Per corroborar la hipòtesi, es van examinar mostres de pàncrees de pacients diabètics I, d'altra banda, es va estudiar la regulació *in vitro* de l'MHC en cèl·lules dels illots de Langerhans; tots aquests estudis es van desenvolupar en humans —mostres normals i patològiques— en models *in vitro* —illots de ratolins— i en dos models animals espontanis de diabetis.

EXPRESSIÓ DE L'MHC EN ILLOTS I DIABETIS TIPUS I

La diabetis tipus I és una malaltia causada per la destrucció selectiva de les cèl·lules productores d'insulina dels illots de Langerhans. En la majoria dels casos, la malaltia es manifesta abans dels quaranta anys, amb pics als sis i dotze anys. Al voltant del 20 % dels pacients presenten antecedents familiars de diabetis tipus I; d'altra banda, un 20 % dels pacients presenten associació amb altres malalties autoimmunitàries òrganoespecífiques, com ara la malaltia de Hashimoto, mixedema primari, malaltia de Graves, adrenalitis autoimmunitària i anèmia perniciosa. Els pacients de diabetis tipus I tenen sovint al seu sèrum autoanticossos contra diversos antígens insulars i també contra cèl·lules de la tiroide i parietals gàstriques. Aquesta malaltia presenta una forta associació amb alguns al·lels de HLA de classe II, particularment DR3, DQW8 i DR4 (Nepom, 1990).

Les cèl·lules insulars endocrines humanes normals expressen nivells baixos de molècules de classe I i no expressen classe II (Pujol-Borrell,

1986). A la diabetis tipus I es van detectar canvis importants en l'expressió de HLA.

Patologia dels illots a la diabetis tipus I

Les dues característiques principals dels illots a la diabetis tipus I són la desaparició de les cèl·lules β i la presència d'infiltrat per cèl·lules mononuclears o insulitis (Meyenburg, 1940).

Aquesta desaparició de cèl·lules productores d'insulina no és completa al moment que es manifesta la malaltia, ja que encara resten un 15 % de cèl·lules β , algunes de les quals persisteixen fins al cap de sis anys després (Foulis, 1984).

La insulitis afecta una tercera part dels illots, tal com es desprèn de l'estudi de mostres d'autòpsies de pacients recentment diagnosticats (Gepts, 1965; Junker, 1977; Gepts, 1978). Els illots d'aquestes glàndules es poden classificar en tres categories: 1) illots sense cèl·lules β residuals però amb contingut normal pel que fa a la resta de cèl·lules, aquests són els illots més freqüents; 2) illots amb insulitis, que són els que contenen alguna cèl·lula β ; 3) illots absolutament normals (Foulis, 1986b). Bottazzo *et al.* van dur a terme el primer estudi immunohistopatològic detallat de la insulitis (Bottazzo, 1985) i van descobrir que la majoria de cèl·lules infiltrants eren limfòcits T CD8+ i que, en menor proporció, hi havia NK i CD4+; no es van veure macròfags. Una proporció de limfòcits T estaven activats ja que expressaven HLA-DR.

Expressió de HLA en pàncrees diabètics

En l'estudi abans esmentat, l'expressió de HLA de classe I estava clarament augmentada a la majoria dels illots. Foulis i Farquharson (Foulis, 1986a), fent servir teixit fixat i anticossos contra determinants de HLA que no es perdien pel procés de fixació en formalina (Epenetos, 1985), van poder ampliar aquesta observació en catorze glàndules més. L'expressió de classe I estava clarament augmentada en els illots que

presentaven insulitis i en aquells que encara tenien un contingut normal de cèl·lules β ; en canvi, no estava augmentada en el illots que ja havien perdut les cèl·lules productores d'insulina. Això suggeria que la hiperexpressió de classe I era anterior a la insulitis. En aquests dos treballs també es va trobar l'expressió ectòpica de classe II en cèl·lules β . Hanafusa *et al.* (Hanafusa, 1990) van confirmar-ho en petites biòpsies de pàncrees de set pacients de diagnòstic recent obtingudes mitjançant laparoscòpia: en quatre dels set casos es va trobar hiperexpressió de classe I i en un cas es va detectar expressió ectòpica de classe II a les cèl·lules β . En un altre estudi recent s'ha demostrat hiperexpressió de classe I en molts illots però no s'ha detectat expressió ectòpica de classe II a les cèl·lules β (Hanninen, 1992). A la nostra Unitat hem estudiat recentment el pàncrees d'un pacient mort al cap de poc temps del diagnòstic, i hem detectat que un 58 % dels illots expressaven HLA de classe I a les cèl·lules endocrines, mentre que un 18 % dels illots amb cèl·lules positives per insulina mostraven expressió ectòpica de classe II a les cèl·lules endocrines, però no restringida a les β (Somoza, 1992). En general, doncs, es pot concloure que els illots sense cèl·lules β no expressen classe II ni tenen insulitis, la qual cosa indica una possible relació entre ambdós factors.

Molècules d'adhesió en illots

La migració limfocitària segueix dos patrons: 1) Recirculació de les cèl·lules T per adhesió als *homings receptors* (carbohidrats expressats en certes cèl·lules endotelials) mitjançant receptors especialitzats com ELAM-1; 2) limfòcits que migren als llocs d'inflamació a causa de la producció local de citocines (IFN- γ , TNF- α i IL-1) que activen les cèl·lules endotelials dels capil·lars, de manera que aquestes presenten nivells elevats de molècules d'adhesió com l'*inter cellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) augmentant la seva adhesivitat (Dustin, 1986; Pober, 1987). Aquest segon tipus de mecanisme

podria ser important en els pàncrees diabètics, les cèl·lules endotelials dels quals expressen nivells elevats d'ICAM-1 dintre i al voltant dels illots (Hanafusa, 1990, Hanninen, 1992; Somoza *et al.*, en preparació). Recentment s'han descrit nivells circulants d'ICAM-1 i L-selectina en pacients acabats de diagnosticar de diabetis tipus I i familiars de primer grau (Lampeter, 1992), factor important si es té en compte que la inflamació insular és un procés local i reduït. Els nivells elevats de molècules d'adhesió ja havien estat descrits durant els processos inflamatoris i de dany tissular (Rothlein, 1991).

Algunes molècules d'adhesió com ara ICAM-1 i LFA-3 (*lymphocyte function associated antigen-3*), lligands de LFA-1 i CD2 respectivament, són importants durant la resposta immunitària, no només per l'ajut que donen als limfòcits per migrar als llocs d'inflamació, sinó també perquè són mitjanceres de l'adhesió entre els limfòcits i les cèl·lules diana i poden proporcionar senyals d'activació a les cèl·lules efectores.

Com s'esperava, les cèl·lules β no expressen ICAM-1, però l'expressió d'aquesta molècula s'indueix sota l'efecte d'IFN- γ i/o TNF- α (Vives, 1991; Campbell, 1988). D'altra banda, les cèl·lules insulars expressen ICAM-1 de manera espontània al cap de poques hores d'estar en cultiu, aquest és un comportament observat també en tiròcits humans (Tolosa, 1992), fenomen a tenir en compte si es precultiven els illots prèviament a un possible trasplantament. D'altra banda, les cèl·lules β no expressen nivells detectables de LFA-3 ni en condicions basals ni després d'un tractament amb citocines.

Segons senyals

Les cèl·lules T requereixen altres senyals per a la seva activació, a més del senyal generat per la interacció del TCR amb el complex MHC + pèptid (Schwartz, 1992). Aquests altres senyals, coneguts per *coestimuladoris* o *segons senyals*, acostumen a provenir de la cèl·lula presentadora

d'antigen (APC). Una de les principals molècules responsables de la coestimulació és B7, lligand de CD28 i CTLA4 dels limfòcits. Les molècules d'adhesió també poden tenir un paper important en l'activació de les cèl·lules T: la unió d'ICAM-1 a LFA-1 ve seguida per una entrada de Ca^{++} (Carrera, 1988) mentre que CD2 pot mitjançar en l'activació independent d'antigen (Denning, 1988; Bockenstedt, 1988). Algunes citocines també poden actuar com a segons senyals. L'estimulació per mitjà del TCR sense segons senyals té com a resultat una «paràlisi» de la cèl·lula T (Lamb, 1983). El paper d'aquest mecanisme en la inducció de tolerància s'està investigant (Lamb, 1983).

Citocines

Per establir la importància de les citocines en el procés destructiu que porta a la diabetis, s'ha estudiat la presència d'aquestes molècules en pàncrees de pacients diabètics. En l'estudi de Foulis *et al.* es va detectar IFN- α en les cèl·lules β dels pàncrees diabètics (Foulis, 1987) —fins i tot en illots normals—, i IFN- γ en un 45 % dels limfòcits que infiltraven els illots (Foulis, 1991). Més recentment, mitjançant la tècnica de la PCR (reacció en cadena de la polimerasa), s'ha detectat IFN- α , IFN- β i IL-6 en el pàncrees d'un diabètic de diagnòstic recent (Somoza, 1993).

INDUCCIÓ *IN VITRO* DE L'EXPRESSIÓ DE L'MHC EN ILLOTS

Les molècules de l'MHC de classe I són expressades de manera constitutiva i en nivells baixos a les cèl·lules insulars humanes (Baekkeskov, 1981). Els IFN- α , β o γ indueixen un ràpid i important increment a la seva expressió (Nepom, 1990). D'altra banda, la inducció de HLA de classe II requereix la combinació d'IFN- γ més TNF- α , característica que contrasta amb el comportament de la majoria de les cèl·lules per

a les quals l'IFN- γ és un estímul suficient (Pujol-Borrell, 1987b). En aquest sentit, la regulació de l'expressió de HLA a les cèl·lules β és similar a la de les neurones, oligodendròcits (Mauerhoff, 1988) i cèl·lules de Sertoli (Tokuda, 1990). En ratolins, el panorama és encara més complex, atesa la capacitat de les citocines per induir classe II depèn de la soca (Campbell, 1988).

Altres estudis *in vitro* demostren que els illots de rates BB (soca susceptible de patir diabetis) expressen ràpidament classe II sota l'efecte d'IFN- γ mentre que els illots d'animals de la mateixa soca, però resistent a desenvolupar diabetis, són resistent a l'IFN- γ (Walker, 1988); fóra possible que, en el primer cas, els animals ja haguessin estat exposats a les citocines, a causa de la insulitis que, en aquest model, apareix molt aviat en la vida de l'animal. També la línia cel·lular d'insulinoma de rata RINm5F pot ser induïda a expressar classe II després d'una incubació amb IFN- γ (Varey, 1988); el nivell de classe II assolit per la inducció sembla, però, més baix que en illots normals de rata. El mateix efecte es detecta en comparar els illots humans amb la línia cel·lular HP62, generada per transfecció d'illots humans amb un vector portador de la regió primerenca del virus SV40 (Soldevila, 1991). Aquestes diferències es deuen al fet que les línies cel·lulars transformades presenten variacions importants respecte a l'expressió de HLA en comparació amb cèl·lules normals del mateix llinatge.

La infecció de cèl·lules insulars humanes *in vitro* amb reovirus (Campbell, 1988) i virus de la parotiditis indueix un increment de l'expressió de classe I; d'altra banda, la infecció d'una línia cel·lular d'insulinoma humà amb virus del xarrampió o de la parotiditis indueix increment tant en l'expressió de classe I com II (Cavallo, 1992). Aquests efectes poden ser deguts a l'alliberament de citocines per part de les cèl·lules insulars infectades.

El descobriment que la combinació d'IFN- γ + TNF- α indueix l'increment en l'expressió d'ICAM-1, HLA de classe I i II a la cèl·lula β

contrasta amb el fet que els illots trobats en els pàncrees diabètics només hiperexpressin HLA de classe I i, en pocs casos, classe II, mentre que ICAM-1 només es troba expressat de manera moderada (Hanninen, 1992; Somoza, 1992). Això implica que hi deuen haver altres factors implicats a part de l'IFN- γ i el TNF- α .

Diferències d'inducció de classe II

Donades les discrepàncies descrites pel que fa a la inducció de classe II en illots murins, es van dur a terme estudis *in vitro* de la cinètica d'inducció de l'MHC de classe I i II (Leiter, 1989) en macròfags i cèl·lules insulars, es va demostrar les diferències entre soques, cosa que suggereix l'existència d'elements genètics. Pel que fa a les diferències respecte al teixit emprat, s'han demostrat diferències a la inducció de l'MHC de classe II dependents de les soques en astròcits en estudiar l'encefalomielitis experimental (Leiter, 1989); en cultius primaris de tiroïdes humans estimulats amb IFN- γ s'han observat diferències interindividuais (Obiols, 1992). Tot això, juntament amb la descripció de variants al·lèliques a la regió reguladora dels gens DQ (Andersen, 1991), suggereix que un component de la predisposició a la malaltia conferida pels haplotips HLA poden ser algunes d'aquestes seqüències reguladores.

Hi ha una expressió defectiva de classe I en la diabetis?

Els esplenòcits del ratolí NOD i els limfòcits de pacients diabètics presenten nivells disminuïts de classe I (Faustman, 1992). Aquest defecte sembla secundari respecte a un defecte en els transportadors peptídics (TAP) —codificats per gens localitzats a la regió de l'MHC (Jaraquemada, 1992; Mónaco, 1990)— que porten pèptids endògens al reticle endoplasmàtic,

on s'uneixen de manera estable a les molècules de classe I. Per a una correcta presentació, és necessària la integritat funcional del TAP, tal com demostra el ratolí TAP *knockout* (Van-Kaer, 1992). En el ratolí NOD, la reducció de l'expressió de classe I dona lloc a una resposta defectiva i podria interferir en el procés de selecció, cosa que permetria a moltes cèl·lules T autoreactives escapar a la selecció (Gaskins, 1992).

VIRUS I DIABETIS TIPUS I HUMANA

El possible paper dels virus a la IDDM es basa de moment en evidències indirectes de tipus epidemiològic i serològic d'una banda, i de tipus experimental de l'altra.

Evidències epidemiològiques i serològiques

La incidència de la IDDM presenta unes variacions estacionals —amb pics a la tardor i a l'hivern— a més a més d'uns pics d'edat que coincideix amb el canvi escolar. Tot això suggereix un paper etiològic dels virus comú a la patogènesi de la IDDM (Gamble, 1969; Durruty, 1979; Gamble, 1969). També s'han descrit títols elevats d'IgM anti-Coxsackie en pacients recentment diagnosticats d'IDDM (King, 1983). El seguiment de familiars de primer grau de pacients d'IDDM que més tard han esdevingut diabètics demostra l'existència d'un llarg període, previ a l'aparició de la simptomatologia, en el qual es detecten autoanticossos mentre que la massa de cèl·lules β decreix lentament. Per tant, els virus implicats en aquesta malaltia no actuarien de manera aguda (Yoon, 1979), tot i que podrien accelerar l'aparició dels símptomes en un individu amb baixa reserva insulínica. Seria possible, per tant, que una infecció crònica o latent en els illots fos la causa primària del procés autoimmunitari que portaria a la IDDM.

Dificultats en la detecció de virus en illots humans

La localització anatòmica del pàncrees i el risc de pancreatitis que comporta una punció dificulten la pràctica de dur a terme biòpsies a pacients diabètics per obtenir material per investigar.

Les dades actuals que suggereixen una infecció viral en pacients diabètics són de tipus indirecte com ara:

1) La presència d'IFN- α (produït per cèl·lules infectades per virus) en cèl·lules β humanes obtingudes d'autòpsies de pacients diabètics (Foulis, 1987).

2) L'increment de freqüència d'IDDM en pacients amb síndrome de rubèola congènita (Forrest, 1971).

3) La detecció de seqüències de CMV en el DNA de limfòcits de pacients diabètics (Pak, 1988), i també la reactivitat enfront dels illots d'un monoclonal generat per immunització amb CMV (Pak, 1988).

4) La detecció de retrovirus en els illots del ratolí NOD.

5) La implicació dels retrovirus en altres malalties autoimmunitàries, com la malaltia de Graves (Ciampolillo, 1989 i Lagaye, 1992), el lupus sistèmic eritematós associat a la SIDA (De Clerck, 1988), l'esclerosi múltiple (Reddy, 1989) i la síndrome de Sjögren (Talal, 1990).

El mimetisme molecular i/o reaccions creuades, la modificació en el repertori T i la inducció de l'expressió de classe II en les cèl·lules diana són mecanismes proposats com a explicació de la inducció d'autoimmunitat per part dels virus. Dels resultats obtinguts amb models transgènics s'afegiria la possibilitat que el virus infectiu de la cèl·lula β induís segons senyals estimuladors de la resposta antiviral i autoimmunitària.

Hi ha hagut intents de detecció de seqüències virals en illots de pacients diabètics (Foulis, 1990), amb resultats negatius. El nostre grup ha investigat la presència d'adenovirus i retrovirus en dos pàncrees de pacients diabètics per PCR,

amb resultats negatius; la inoculació de teixit homogenat d'aquests òrgans en fibroblasts embrionaris humans, cèl·lules HEP-2 i Vero no van induir canvis citopàtics. Les imatges de microscòpia electrònica tampoc no van revelar partícules víriques ni canvis citopàtics (Somoza, 1993).

EL RATOLÍ NOD

El ratolí NOD (*non obese diabetic*) és una soca amb diabetis espontània semblant a la humana (Tochino, 1986). Aquests animals desenvolupen diabetis com a conseqüència de la destrucció autoimmunitària selectiva de les cèl·lules β amb pèrdua de pes, cetoacidosi, poliúria i polidípsia. La incidència depèn de la colònia, però és més alta en femelles (72-100 %) que en mascles (39-50 %). Aquest model té predisposició genètica conferida almenys per sis gens (Todd, 1991), un d'ells localitzat a la regió MHC amb homologia amb el DQW8 humà.

Els limfòcits T, macròfags i cèl·lules NK semblen importants per al desenvolupament de la insulinitis. El tractament amb sílica (un agent tòxic per als macròfags) prevé la malaltia (Charlton, 1988); d'altra banda, la diabetis es pot transferir a animals sans mitjançant limfòcits (Miller, 1988; Bendelac, 1987; Haskins, 1989) de ratolins ja diabètics.

Hi ha controvèrsia sobre l'expressió ectòpica de classe II en les cèl·lules β del ratolí NOD (Tarvi, 1986; Motojima, 1986; Signore i Hanafusa, 1987). Aquests animals tenen anomalies estructurals en els gens I (Acha-Orbea, 1988); els productes I-E no són expressats a causa d'una deleció en el promotor de la cadena alfa (Hattori, 1986), per tant, la detecció de classe II pot ser problemàtica. Recentment s'ha descrit expressió ectòpica de classe II (Formby, 1989) (I-A^k) en les cèl·lules β del NOD de manera precedent a la insulinitis. Les cèl·lules β positives per classe II poden estimular la proliferació dels limfòcits autòlegs CD4+. Altres resultats de clons de limfòcits T indiquen que les cèl·lules β poden estimular directament les

cèl·lules T.

Hi ha un ratolí NOD transgènic (Lund, 1990) que expressa la cadena I-A β modificada (on la Pro 56 varia la conformació) o la I-E α normal, de manera que queda protegit enfront la IDDM; els illots d'aquest model presenten un infiltrat insular mínim no associat a la delecio de cap membre de la família de V β dels limfòcits T. Tot i que el mecanisme de protecció no és clar, podria ser un canvi en el repertori T.

La microscòpia electrònica dels illots del NOD ha demostrat la presència de partícules semblants a les retrovirals en les cèl·lules β (Fujita, 1984; Leiter, 1985). Més recentment s'ha detectat la proteïna *gag* en els illots del ratolí NOD. Cal tenir en compte, però, en la interpretació d'aquests descobriments, que els retrovirus són relativament freqüents en els ratolins.

LA RATA BB

Les rates de la soca BB desenvolupen una diabetis insulino-dependenta semblant a la humana que va lligada a l'MHC i a un defecte genètic que determina limfopènia (Mordes, 1987).

En un estudi immunohistopatològic de seccions de pàncrees de rates BB en diferents estats previs a la diabetis (Dean, 1986), es va detectar classe II incrementada als capil·lars dels illots en una fase molt primerenca, mentre que les cèl·lules β n'expressaven només en una fase molt avançada de la insulitis.

INDUCCIÓ DE LA DIABETIS TIPUS I EN ANIMALS MITJANÇANT VIRUS

Una variant del virus de l'encefalomiocarditis (EMCV) infecta selectivament les cèl·lules β de certes soques. En el ratolí DBA/2 apareix una diabetis com a conseqüència directa de l'atac a la cèl·lula β , mentre que en el ratolí BALB/c hi intervenen mecanismes virals i immunopatològics (però no autoimmunitaris). A diferència

dels models espontanis de diabetis, els gens de l'MHC no determinen susceptibilitat (Craighead, 1990). Les soques diabetogèniques de Coxsackie B4 causen una síndrome en ratolins susceptibles molt semblant a la diabetis en humans (Webb, 1976). Guberski *et al.* (Guberski, 1991) van observar una elevada incidència de diabetis inesperada en una colònia de rates resistents a la diabetis —(DR) BB/Wor— directament relacionada amb una infecció per parvovirus. L'antigen viral no es va detectar en els illots i la destrucció de les cèl·lules β va ser posterior a la insulitis, la qual cosa suggereix que la infecció viral provoca una resposta autoimmunitària contra els illots.

RATOLINS TRANSGÈNICS I CÈL·LULES BETA

Des que s'han identificat les regions reguladores del gen de la insulina ha estat possible generar construccions on el promotor de la insulina dirigeix la transcripció d'un gen determinat. Aquest element regulador s'anomena pInspro (promotor de la insulina) o RIP (promotor de la insulina de rata). Quan aquesta construcció s'introdueix en el genoma murí per generar un animal transgènic, s'indueix una expressió forta i selectiva del transgèn a les cèl·lules β . Diferents grups han utilitzat aquesta estratègia per comprovar l'efecte de l'expressió *de novo* dels productes de l'MHC (Pujol-Borrell, 1988; Harrison, 1989), proteïnes virals i citocines a la cèl·lula β . Aquests experiments han canviat algunes de les idees sobre tolerància perifèrica.

Expressió de l'MHC isogènic o al·logènic

Les construccions (Sarvetnick, 1988) pInsproI-A α^d i pInsproI-A β^d van ser introduïdes al genoma d'una soca de ratolí singènica. El transgènic resultant (F1 amb ambdues cadenes I-A α i β) esdevenia diabètic i requeria insulina a les vuit setmanes d'edat. Els illots mostraven

una clara expressió de classe II i manca d'insulina, però no es detectava insulinitis ni cap evidència d'autoimmunitat.

Lo *et al.* (Lo, 1988) van utilitzar construccions similars (InsI-E α^d i InsI-E β^b) per incorporar-les a ratolins defectius per l'expressió de I-E endogen i que, per tant detectaven el transgèn com a al·logènec. Els animals esdevenien diabètics, però sense insulinitis ni cap evidència de resposta immunològica contra els illots. Les cèl·lules β expressaven alts nivells de classe II, però només es tenien dèbilment per insulina. Els experiments de cultius de *Mixed lymphocytes* van demostrar que aquest model transgènec era tolerant a les molècules de l'MHC codificades pel transgèn.

Resulta interessant la variació del mecanisme de tolerància als productes d'I-E b en aquests transgènics respecte als dels ratolins que expressen normalment I-E b . En el ratolí normal I-E $^{b+}$, les cèl·lules T que porten un TCR codificat pels gens V β 17 no es detecten, tot i que els gens de V β 17, són presents en el genoma. Els TCR codificats per V β 17 reconeixen principalment I-E, fet que s'ha considerat com una demostració de la deleció clonal. En canvi, el model transgènec per InsI-E b conté en el seu repertori limfòcits amb receptors codificats pels gens V β 17 però continuen essent tolerants a l'I-E b (Burkly, 1988; Parham, 1988). Posteriors experiments han demostrat que els illots amb classe II I-E $^{b+}$ d'aquests transgènics no eren rebutjats en trasplantar-los a ratolins I-E $^-$. D'altra banda, quan els ratolins receptors dels illots van ser tractats prèviament al trasplantament amb cèl·lules de melsa I-E $^{b+}$, van ser capaços de respondre i destruir les cèl·lules insulars del transgènec I-E $^+$. Això suggereix que les molècules de classe II eren reconegudes per les cèl·lules efectores, però les cèl·lules β que presenten classe II no eren capaces, per elles mateixes, d'iniciar una resposta immunitària per part dels limfòcits T *in vivo*. Per tal d'aprofundir en els factors que determinen l'inici de la presentació antigènica per part de les cèl·lules insulars positives per classe II, es van dur a terme experiments *in vitro*

amb clons de cèl·lules T restringits per I-E específics per pèptids del virus de l'herpes. El precltiu dels illots positius per I-E b del ratolí transgènec amb aquests clons fa que aquests perdin la capacitat de resposta enfront del pèptid viral, fins i tot quan l'antigen fou presentat per cèl·lules presentadores d'antigen convencionals (Markmann, 1988). En conclusió, la presentació antigènica per part de cèl·lules β que expressen classe II desemboca en una paràlisi de les cèl·lules T.

Els experiments del grup de Miller (Allison, 1988) condueixen a conclusions similars. A la vista de l'increment de l'expressió de classe I en els illots d'un pacient recentment diagnosticat de diabetis i dels canvis similars observats *in vitro* infectant cèl·lules amb reovirus, els autors van crear un model transgènec per comprovar l'efecte d'una intensa expressió de classe I en les cèl·lules β . El transgèn era una construcció amb el promotor del gen de la insulina amb H-2K b , i va ser introduït a diferents soques de ratolins, algunes de les quals eren singèniques i d'altres al·logèniques respecte al transgèn. Una alta proporció dels animals transgènics van desenvolupar diabetis sense signes de reacció immunitària contra les cèl·lules insulars fortament positives per classe I. La timectomia no va influir en el desenvolupament de la malaltia, i les cèl·lules T de la perifèria eren tolerants als productes al·logènics de classe I expressats per la cèl·lula β . Les cèl·lules T tímiques no eren tolerants, i la tolerància perifèrica va desaparèixer quan les cèl·lules β van expressar classe I en la vida adulta de l'animal (Morahan, 1989). Aquests resultats suggereixen novament que les cèl·lules β poden presentar antígens de manera tolerogènica.

La disparitat de resultats oferts pels models transgènics fa qüestionar la importància dels pèptids presentats en situacions al·logèniques. Una errada d'aquests experiments és que en alguns models de transgènics anomenats *leaky* es poden detectar transcrits del transgen al timus. D'aquests experiments es qüestiona la manca de secreció insulínica en aquests animals. El més

probable és que la producció massiva de molècules de l'MHC sigui per si mateixa deletèria per la cèl·lula β *in vivo*. Una altra hipòtesi és que la secreció insulínica s'impedeix perquè l'hormona forma complexos amb les molècules de l'MHC en els compartiments pre-secretores citoplasmàtics de la cèl·lula β (Allison, 1988); aquest argument es basa en l'alta avidesa de les molècules de l'MHC pels pèptids. També podria ser que, en incorporar diverses còpies del transgen, la massiva expressió de l'MHC saturaria la capacitat de producció d'insulina.

Expressió de citocines

Sarvetnick *et al.* (Sarvetnick, 1990) van dissenyar un transgènic en què el gen de l'IFN- γ estava sota el control del promotor de la insulina; el resultat va ser el desenvolupament de diabetis i inflamació amb expressió ectòpica de classe II en els illots. Un altre model va ser el transgènic amb IFN- α a les cèl·lules β , que també va desenvolupar diabetis (Stewart, 1993).

Recentment s'han descrit dos models transgènics que expressen factor de necrosi tumoral- β (TNF- β) (Picarella, 1992) i TNF- α (Higuchi, 1992) en les cèl·lules β . Ambdós models presentaven una important infiltració limfocitària malgrat que cap dels dos no va progressar cap a diabetis, tot i haver-hi reducció de la massa de cèl·lules endocrines, fibrosi insular i creixement intransular dels ducs (regeneració dels illots?). Aquests dos models demostren clarament que la inflamació insular causada per l'expressió del TNF no és diabètica per si mateixa. La diferència entre el model d'IFN- γ i el de TNF indica que l'IFN- γ és més eficient en generar —directament o indirectament— segons senyals per l'activació de les cèl·lules T.

Cal esmentar que, en contrast amb els resultats dels ratolins transgènics, la capacitat de les cèl·lules endocrines positives per classe II de presentar antígens exògens i endògens *in vitro* a

les cèl·lules T ha estat demostrada en tiròcits murins (Charriere, 1982; Salamero, 1985) i humans (Londei, 1985; Londei, 1984; Wataru, 1988; Grubeck-Loebenstein, 1988).

Ratolins amb productes virals transgènics en les cèl·lules beta

Amb la tecnologia dels ratolins transgènics s'ha provat si l'efecte de l'expressió de neoantígens (per exemple, antígens virals) en la membrana de les cèl·lules β pot ser el primer fenomen en el procés que porta a la diabetis.

Es va introduir un transgèn fet amb el promotor de la insulina de rata amb l'antigen viral T de SV40 (Adams, 1987) (un potent oncogen viral). L'animal va desenvolupar hiperplàsia dels illots, tumors de tipus insulinoma i, en alguns casos, pancreatitis amb autoanticossos contra els antígens T de SV40, però en cap cas van desenvolupar diabetis. La resposta autoimmunitària es va donar quan el transgèn es va començar a expressar en illots d'animals adults, mentre que l'expressió neonatal dona lloc a tolerància. En un altre model, l'expressió de l'hemaglutinina del virus de la grip en les cèl·lules β (Roman, 1990) causa una infiltració limfocitària que destrueix les cèl·lules productores d'insulina i causa diabetis, amb presència d'autoanticossos. També hi ha transgènics que expressen la nucleoproteïna (NP) o la glicoproteïna (GP) del virus de la coriomeningitis (LCMV) a la cèl·lula β (Oldstone, 1991); aquest model no desenvolupa diabetis, excepte quan l'animal és infectat pel virus, cosa que indica que un gen viral introduït a la línia germinal i expressat en les cèl·lules β no induïx una tolerància real. Un altre grup va generar una variant creuant el transgèn LC MV-GP amb un altre transgèn portador de TCR específic per LCMV-GP (Ohashi, 1991); aquest model no es va fer diabètic fins al moment que va ser infectat amb LCMV, fet que indica que les cèl·lules T autoreactives poden romandre inactives fins que

no es dona l'activació adequada.

Transgènics dobles i triples amb incorporació de segons senyals

Schonrich *et al.* (Schonrich, 1991) van generar un doble transgènic amb les construccions pIns H-2K^b i els gens reordenats de les cadenes α i β del TCR que reconeixen H-2K^b. Les cèl·lules T que expressaven nivells alts del TCR transgènic van ser delecionades intratímicament, però algunes cèl·lules T específiques per K^b van romandre a la perifèria i eren aparentment indiferents a l'expressió de K^b als illots. Aquest transgènic es va creuar amb un altre que expressava interleucina-2 (IL-2) en les cèl·lules β (Heath, 1992) i va resultar un triple transgènic que va desenvolupar diabetis amb insulinitis. Aquests resultats indiquen que les cèl·lules T autoreactives que ignoren els autoantígens poden causar diabetis sota l'estímul de la IL-2.

Més recentment s'han descrit transgènics que incorporen B7 a les cèl·lules β (Gueder, 1992). Aquests models, que no desenvolupen diabetis, sí que ho fan en creuar-se amb el transgènic que expressa I-E als illots o amb el que expressa TNF. Una altra línia de transgènic per B7 que no fa diabetis (Harlan, 1993), sí que en fa quan se li injecta una dosi subdiabetogènica d'estreptozotocina.

Per tant, sembla que les cèl·lules endocrines que expressen classe II poden ser ignorades per les cèl·lules T o desencadenar una resposta segons les circumstàncies. Una hipòtesi sobre aquest fenomen es basa en la importància dels segons senyals (Janeway, 1989), ja que hi ha treballs que demostren que una presentació incompleta pot induir anèrgia (Lamb, 1983; Madsen, 1988; Jenkins, 1987). El segon senyal podria ser proporcionat per la IL-2 (Morahan, 1989), altres citocines produïdes per les APC convencionals (Jenkins, 1988), la via del B7 i el seu lligand CD28, les molècules d'adhesió, o bé un conjunt de totes elles. Per tant, l'expressió de classe II seria només una part del procés de presentació, i caldrien citocines que podrien induir tant

l'expressió de totes les molècules de membrana que participarien en la presentació la cèl·lula β , com els segons senyals perquè aquesta es portés a terme. En cas que l'expressió de classe II fos un fenomen secundari i tardà, la presentació de les cèl·lules β tindria poca importància en el procés autoimmunitari.

CONCLUSIONS

L'estudi de l'expressió de l'MHC en les cèl·lules β ens porta més enllà del que semblava en un principi la interpretació de la hipòtesi de l'expressió aberrant de classe II, ja que la complexitat de la presentació antigènica i l'activació de les cèl·lules T no eren gaire conegudes.

El fenomen de la hiperexpressió de l'MHC en la cèl·lula diana de les malalties autoimmunitàries ha estat darrerament molt investigat. Malgrat això, no se sap si es tracta d'un fenomen secundari a l'acció de les citocines alliberades pels limfòcits T com a conseqüència d'una infecció vírica o d'un fenomen realment involucrat en la resposta autoimmunitària. Una tercera possibilitat és que hi hagi una inducció directa d'un virus no citopàtic que infectés les cèl·lules β .

A causa d'això i des d'una altra perspectiva, les cèl·lules β han esdevingut paradigmàtiques en l'estudi de la tolerància perifèrica. La gran quantitat de models transgènics portadors de tot tipus de molècules a les cèl·lules β no ens han aclarit del tot el paper del silenci immunològic, de l'anèrgia i supressió en el manteniment de la tolerància perifèrica, però han aportat dades per al coneixement actual de la immunologia.

Agraïments

Aquest treball ha estat subvencionat per beques del Fondo de Investigaciones Sanitarias (Projecte 90E1262-6-E), de la Fundación Ramón Areces, CAYCIT (Projecte PB860/86) i

Eureka (Projecte EU 286). Volem agrair al Prof. Màrius Foz el seu continuat suport i a tots els membres de la Unitat d'Immunologia el seu ajut.

BIBLIOGRAFIA

- ACHA ORBEA, H. i H. O. MCDEVITT (1988). The first external domain of the non obese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. **PNAS USA** **84**: 2435-2439.
- ADAMS, T. E., S. ALPERT i D. HANAHAN (1987). Non-tolerance and autoantibodies to a transgenic self antigen expressed in pancreatic beta cells. **Nature** **325**: 223-228.
- ALLISON, J. A., I. L. CAMPBELL, G. MORAHAN, T. E. MANDEL, L. C. HARRISON i J. F. A. P. MILLER (1988). Diabetes in transgenic mice resulting from over-expression of Class I histocompatibility molecules in pancreatic B cells. **Nature** **333**: 529-533.
- ANDERSEN, C. L., J. S. BEATY, W. NETTLES, C. E. SEYFRIED, G. T. NEPOM i B. S. NEPOM (1991). Allelic polymorphism in transcriptional regulatory regions of HLA-DQB genes. **J. Exp. Med.** **173**: 181-192.
- BAEKESKOV, S., T. KANATSUNA, L. KLARESKOG, D. A. NIELSEN, P. A. PETERSON, A. H. RUBENSTEIN, D. F. STEINER i A. LERNMARK (1981). Expression of major histocompatibility antigens on pancreatic islet cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**: 6456-6460.
- BENDELAC, A., C. CARNAUD, C. BOITARD i J. F. BACH (1987). Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both populations L3T4+ and Lyt 2+ cells. **J. Exp. Med.** **166**: 823-32.
- BOCKENSTEDT, L., M. A. GOLDSMITH, M. DUSTIN, D. OLIVE, T. A. SPRINGER i A. WEISS (1988). The CD2 ligand LFA-3 activates T cells but depends on the expression and function of the antigen receptor. **J. Immunol.** **141**: 1904-1911.
- BOTTAZZO, G. F., B. M. DEAN, G. M. McNALLY, E. H. MCKAY, P. G. F. SWIFT i D. R. GAMBLE (1985). *In situ* characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. **New Engl. J. Med.** **313**: 353-360.
- BOTTAZZO, G. F., R. PUJOL-BORRELL, T. HANAFUSA i M. FELDMANN (1983). Hypothesis: Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in the induction of endocrine autoimmunity. **Lancet** **2**: 1115-1119.
- BOTTAZZO, G. F., I. TODD, R. MIRAKIAN, A. BELFIORE i R. PUJOL-BORRELL (1986). Organ-specific autoimmunity: A 1986 overview. **Immunol. Rev.** **94**: 137-169.
- BURKLY, L., D. LO, O. KANAGAWA, R. L. BRINSTER i R. A. FLAVELL (1989). T cell tolerance by clonal anergy in transgenic mice with non lymphoid expression of MHC class II I-E. **Nature** **342**: 564-566.
- CAMPBELL, I. L., A. CUTRI, D. WILKINSON, A. W. BOYD i L. C. HARRISON (1988). ICAM-1 is induced on isolated endocrine islets by cytokines but not by reovirus infections. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**: 4282-4286.
- CAMPBELL, I. L., L. C. HARRISON, R. ASHCROFT i I. JACK (1988). Reovirus infection enhances expression of class I on human pancreatic beta and rat insulinoma cells. **Diabetes** **37**: 362-365.
- CAMPBELL, I. L., L. OXBROW, T. KAY i L. C. HARRISON (1988). Regulation of MHC protein expression in pancreatic beta cells by IFN-gamma and TNF-alpha. **Mol. Endocrinol.** **2**: 101-107.
- CARRERA, A. C., M. RINCON, F. SÁNCHEZ-MADRID *et al.* (1988). Triggering of co-mitogenic signals in T cell proliferation by anti LFA-1 (CD18, CD11a), LFA-3 and CD7 monoclonal antibodies. **J. Immunol.** **141**: 1919-1924.
- CAVALLO, M. G., M. G. BARONI, A. TOTO, A. J. H. GEARING, T. FORSEY i D. ANDREANI (1992). Viral infection induces cytokine release by beta islet cells. **Immunology** **75**: 664-668.
- CHARLTON, B., A. BALCELJ i T. E. MANDEL (1988). Administration of silica particles or anti-lyt2 antibody prevents b-cell destruction in NOD mice given cyclophosphamide. **Diabetes** **37**: 930-935.
- CHARRIERE, J. i M. MICHEL-BECHET (1982). Syngeneic sensitization of mouse lymphocytes on monolayers of thyroid epithelial cells. III induction of thyroiditis by thyroid sensitized T lymphoblasts. **Eur. J. Immunol.** **12**: 421-425.
- CIAMPOLILLO, A., V. MARINI i R. MIRAKIAN, *et al.* (1989). Retroviral-like sequences in Graves' Disease: Implications for human autoimmunity. **Lancet** **1**: 1096-1100.
- CRAIGHEAD, J. E., S. A. HUBER i S. SRIRAM (1990). Animal models of Pircornavirus-induced autoimmune disease: Their possible relevance to human disease. **Lab Investigation** **63**: 432-446.
- DE CLERCK, L., M. COUTTENYE, M. DE BROE i W. STEVENS (1988). Acquired immunodeficiency syndrome mimicking Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** **31**: 272-275.
- DEAN, B. M., R. WALKER, A. J. BONE, J. D. BAIRD i A. COOKE (1986). Prediabetes in the spontaneously diabetic BB/E rat: lymphocytic subpopulations in the pancreatic infiltrate and expression of rat MHC class II in the endocrine cells. **Diabetologia** **28**: 464-466.
- DENNING, S. M., M. L. DUSTIN, T. A. SPRINGER, K. H. SINGER i D. F. HYNES. (1988). Purified lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3) activates human thymocytes via the CD2 pathway. **J. Immunol.** **141**: 2980-2985.
- DURRUTY, P., F. RUÍZ i M. GARCÍA DE LOS RÍOS. (1979). Age at diagnosis and seasonal variation in the onset of insulin-dependent diabetes in Chile (Southern hemisphere). **Diabetologia** **17**: 357-360.

- DUSTIN, M. L., R. ROTHLEIN, A. K. BHAN i C. A. DINARELLO. (1986). Induction by IL-1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). **J. Immunol.** 137: 245-254.
- EPENETOS, A. A., L. G. BOBROW i T. E. ADAMS. (1985). A monoclonal antibody that detects HLA-D region antigen in routinely fixed, wax embedded sections of normal and neoplastic lymphoid tissues. **J. Clin. Pathol.** 38: 12-17.
- FAUSTMAN, D., X. LI, H. Y. LIN, Y. FU, G. EISENBARTH, J. AVRUCH i J. GUO. (1992). Linkage of faulty major histocompatibility complex class I to autoimmune diabetes. *Science*. 254: 1756-1761.
- FORMBY, B. (1989). Mechanisms of autoimmunity in the NOD diabetic mouse. **Diabetologia** 32: 488A.
- FORREST, J. M., M. A. MENSES i J. A. BURGESS (1971). High frequency of diabetes mellitus in young adults with congenital rubella. **Lancet** 2: 332-334.
- FOULIS, A., M. FARQUHARSON, S. CAMERON, M. MCGILL, H. SCHONKE i R. KANDOLF (1990). A search for the presence of the enteroviral capsid protein VP1 in pancreases of patients with Type 1 (insulin-dependent) diabetes and pancreases and hearts of infants who died of coxsackieviral myocarditis. **Diabetologia** 33: 290-298.
- FOULIS, A., M. A. FARQUHARSON i A. MEAGER (1987). Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in Type 1 diabetes mellitus. **Lancet** 2: 1423-1427.
- FOULIS, A. i M. A. FARQUHARSON (1986). Aberrant expression of HLA DR antigens in insulin containing beta cells in recent onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetes** 35: 1215-1226.
- FOULIS, A. K., C. N. LIDDLE i M. A. FARQUHARSON (1986). The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes: a 25 year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. **Diabetologia** 29: 267-279.
- FOULIS, A. K., M. MCGILL i M. A. FARQUHARSON (1991). Insulinitis in type 1 (Insulin dependent) diabetes mellitus in man- macrophages, lymphocytes and interferon-g containing cells. **J. Pathology** 165: 97-103.
- FOULIS, A. K. i J. A. STEWART (1984). 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** 26: 456-461.
- FUJITA, H., H. FUJINO, K. NONAKA, S. TARUI i Y. TOCHINO (1984). Retrovirus-like particles in pancreatic B-cells of NOD (non-obese diabetic) mice. **Biomedical Research**. 5: 67-70.
- GAMBLE, D. R. (1980). The epidemiology of insulin-dependent diabetes with particular reference to virus infection to its aetiology. **Epidem Rev.** 2: 49-70.
- GAMBLE, D. R., M. L. KINSLEY, M. G. FITZGERALD, R. BOLTON i K. W. TAYLOR (1969). Viral antibodies in diabetes mellitus. **Br. Med. J.** 3: 627-630.
- GASKINS, H. R., J. J. MONACO i E. H. LEITER (1992). Expression of intra-MHC transporter (Ham) genes and class I antigens in diabetes-susceptible NOD mice. **Science** 256: 1826-1828.
- GEPTS, W. (1965). Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. **Diabetes** 14: 619-633.
- GEPTS, W. i J. DEMAY (1978). Islet cell survival determined by morphology and immunocytochemical study of the islets of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. **Diabetes** 27 (suppl.): 251-261.
- GRUBECK-LOEBENSTEIN, B., M. LONDEL, C. GEENALL *et al.* (1988). Pathogenic relevance of HLA class II expressing thyroid follicular cells in nontoxic goiter and in Grave's disease. **J. Clin. Invest.** 81: 1608-1614.
- GUBERLSKI, D. L., V. A. THOMAS, W. R. SHEK, A. A. LIKE, E. S. HANDLER, A. A. ROSSINI, J. E. WALLACE i R. M. WELSH (1991). Induction of type 1 diabetes by Kilham's rat virus in diabetes resistant BB/Wor rats. **Science** 254: 1010-1013.
- GUEDER, S. i R. A. FLAVELL (1992). **Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology Functions of the MHC**. Taos, New Mexico.
- HANAFUSA, T., H. FUJINO-KURIHARA, A. MIYAZAKI *et al.* (1987). Expression of class II MHC antigens on pancreatic beta cells in NOD mouse islets. **Diabetologia** 30: 104-108.
- HANAFUSA, T., A. MIYAZAKI, J. MIYAGAWA, S. TAMURA, M. INADA, K. YAMADA, Y. SHINJI, H. KATSURA, H. YAMAGATA, N. ITOH, H. ASAKAWA, H. NAKAGAWA, A. OTSUKA, S. KAWATA, S. KONO i S. TARUI (1990). Examination of islets in the pancreas biopsy specimen from newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. **Diabetologia** 33: 105-111.
- HANAFUSA, T., R. PUJOL-BORRELL, L. CHIOVATO, R. C. G. RUSSELL, D. DONIACH i G. F. BOTTAZZO (1983). Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance for autoimmunity. **Lancet** 2: 1111-1115.
- HANNINEN, A., S. JALKANEN, M. SALMI, S. TOIKKANEN, G. NIKOLAKAROS i O. SIMELL (1992). Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.** 90: 1901-1910.
- HARLAN, D. M., M. L. HUANG, M. L. FREEMAN, L. M. NADLER, R. W. MOREADITH i C. H. JUNE (1993). Transgenic mice expressing the T-lymphocyte costimulatory molecule B7 on pancreatic beta cells. **12th International Immunology and Diabetes Workshop**. Orlando, Florida.
- HARRISON, L. C., I. L. CAMPBELL, J. ALLISON i J. F. A. P. MILLER (1989). MHC molecules and β cell destruction. Immune and non-immune mechanisms. **Diabetes** 36: 815-818.
- HASKINS, K., M. PORTAS, B. BERGMAN, K. LAFFERTY i B. BRADLEY (1989). Pancreatic islet-specific T cell clones from non obese diabetic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 86: 8000-8004.

- HATTORI, M., J. B. BUSE i R. A. JACKSON (1986). The NOD mouse: recessive diabetogenic gene in the major histocompatibility complex. **Science** **231**: 733-735.
- HEATH, W. R., J. ALLISON, M. W. HOFFMANN, G. SCHONRICH, G. HAMMERLING, B. ARNOLD i J. F. A. P. MILLER (1992). Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. **Nature** **359**: 547-549.
- HOGUCHI, Y., P. HERRERA, P. MUNIESA, J. HUARTE, D. BELIN, P. OHASHI, P. AICHELE, L. ORCI, J. D. VASSALLI i P. VASSALLI (1992). Expression of a tumor necrosis factor a transgene in murine pancreatic b cells results in severe and permanent insulinitis without evolution towards diabetes. **J. Exp. Med.** **176**: 1719-1731.
- JANEWAY, C. (1989). Immunogenicity signals 1, 2, 3... and 0. **Immunol. Today** **10**: 283-285.
- JARAQUEMADA, D. i M. MARTÍ (1992). Antigen presentation to T cells: different processing pathways for MHC class I and class II molecules. **Immunologia** **10**: 109-117.
- JENKINS, M. K., J. ASHWELL i R. H. SCHWARTZ (1988). Allogeneic non spleen cells restore the responsiveness of normal T cell clones stimulated with antigens and chemically modified antigens presenting cells. **J. Immunol.** **140**: 3324-3330.
- JENKINS, M.K. i R. H. SCHWARTZ (1987). Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen specific T cell unresponsiveness *in vitro* and *in vivo*. **J. Exp. Med.** **165**: 302-319.
- JUNKER, K., J. EGEBERG, H. KROMANN i J. NERUP (1977). An autopsy study of the islet of Langerhans in acute onset juvenile diabetes mellitus. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** **85**: 699-706.
- KING, M. L., A. SHAIKH, D. BIDWELL, A. VOLLER i J. E. BANATVALA (1983). Coxsackie B-virus-specific IGM responses in children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Lancet** **1**: 1397-1399.
- LAGAYE, S., P. VEXIAU, V. MOROZOV, *et al.* (1992). Human spumaretrovirus-related sequences in the DNA of leukocytes from patients with Graves disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **89**: 10070-100074.
- LAMB, J. R., B. J. SKIDMORE, N. GREEN, J. M. CHILLEZ i M. FELDMANN (1983). Induction of tolerance in influenza virus immune T lymphocytes clones with synthetic peptides of influenza haemagglutinin. **J. Exp. Med.** **157**: 1434-1447.
- LAMPETER, E. R., T. K. KISHIMOTO, R. ROTHLEIN, E. A. MAINOLFI, J. BERTRAMS, H. KOLB i S. MARTIN (1992). Elevated levels of circulating adhesion molecules in subjects at risk for IDDM. **Diabetes** **44**: 1668-71.
- LEITER, E. H. (1985). Type C retroviral production by pancreatic beta cells. Association with accelerated pathogenesis in C3H-db (Diabetic) mice. **Am J Pathol.** **119**: 22-32.
- LEITER, E. H., G. J. CHRISTAMSON, D. V. SERREZE, A. T. TING i S. M. WORTHEN (1989). MHC antigen induction by IFN-g on cultured mouse pancreatic B cells and macrophages. Genetic analysis of strain differences and discovery of an 'occult' class I-like antigen in NOD/It mice. **J. Exp. Med.** **170**: 1243-1262.
- LENSCHOW, D. J., Y. ZENG, J. R. THISTLETHWAITE, A. MONTAG, W. BRADY, M. G. GIBSON, P. S. LINSLEY i J. A. BLUESTONE (1992). Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. **Science** **257**: 789-792.
- LO, D., L. C. BURKLY, G. WIDERA, *et al.* (1988). Diabetes and tolerance in transgenic mice expressing class II molecules in pancreatic beta cells. **Cell** **53**: 159-166.
- LONDEI, M., G. F. BOTTAZZO i M. FELDMANN (1985). Human T cell clones from thyroid autoimmune thyroid glands: specific recognition of autologous thyroid cells. **Science** **228**: 85-89.
- LONDEI, M., J. R. LAMB, G. F. BOTTAZZO, *et al.* (1984). Epithelial cells expressing aberrant MHC Class II determinants can present antigen to cloned human T cells. **Nature** **312**: 639-641.
- LUND, T., L. O'REILLY, P. HUTCHINGS, O. KANAGAWA, E. SIMPSON, R. GRAVELY, P. CHANDLER, J. DYSON, J. K. PICARD, A. EDWARDS, D. KIOUSSIS i A. COOKE (1990). Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by transgenes encoding modified I-A b chain or normal I-E a chain. **Nature** **345**: 727-729.
- MADSEN, J. C., R. A. SUPERINA, K. J. WOOD i P. J. MORRIS (1988). Immunological unresponsiveness induced by recipient cells transfected with donor MHC genes. **Nature** **332**: 161-164.
- MARKMANN, J., D. LO, A. NAJI, R. D. PALMITER, R. L. BRINSTER i E. HNER-KATZ (1988). Antigen presenting function of class II MHC expressing beta cells. **Nature** **336**: 476-479.
- MASSA, P. T., V. TER MEULEN i A. FONTANA (1987). Hyperinducibility of Ia antigen on astrocytes correlates with strain-specific susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**: 4219-4223.
- MAUERHOFF, T., R. PUJOL-BORRELL, R. MIRAKIAN i G. F. BOTTAZZO (1988). Differential expression and regulation of major histocompatibility complex (MHC) products in neural and glial cells of the human fetal brain. **J. Neuroimmunology** **18**: 271-289.
- MEYENBURG, H. V. (1940). Veber «insulinitis» bei Diabetes. **Schweiz Med. Wochenschr.** **21**: 554.
- MILLER, B. J., M. C. APPEL, J. J. O'NEIL i L. S. WICKER (1988). Both Lyt2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. **J. Immunol.** **140**: 52-58.
- MONACO, J. J., S. CHO i M. ATTAYA (1990). Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing. **Science** **250**: 1723-1726.
- MORAHAN, G., J. ALLISON i J. F. A. P. MILLER (1989). Tolerance of class I histocompatibility antigens expressed extrathymically. **Nature** **339**: 622-624.
- MORDES, J. P. i A. A. ROSSINI (1987). **Baillière's Clinical Immunology and Allergy**. Keys to understanding

- autoimmune diabetes mellitus: the animal models of insulin-dependent diabetes mellitus. Baillière Tindall Eds. London, U.K. **1**: 29-52.
- MOTOJIMA, K., V. MULLEN, A. AZAMA i L. WICKER (1986). Ia+ lymphocytes and Ia+ beta cells in NOD mouse islets. *Diabetes* **35** (suppl.1): 69A
- NEPOM, G. T. (1990). A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM. *Diabetes* **39**: 1153-1157.
- OBIOLS, G., L. SANTAMARÍA, M. SOSPEDRA, E. TOLOSA, C. ROURA i R. PUJOL-BORRELL (1992). Interindividual variability of HLA class II expression induction among patients with Graves' disease (GD) and multinodular goitre (MNG). **Ninth International Congress of Endocrinology**, Nice.
- OHASHI, P. S., S. OEHEN, K. BUERKI, H. PIRCHER, C. T. OHASHI, B. ODERMATT, B. MALISSEN, R. M. ZINKERNAGEL i H. HENGARTNER (1991). Ablation of tolerance and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* **65**:305-317.
- OLDSTONE, M. B. A., M. NERENBERG, P. SOUTHERN, J. PRICE i H. LEWICKI (1991). Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* **65**:319-331.
- PAK, C. Y., C. Y. CHA, R. V. RAJOTTE, R. G. MCARTHUR i J. W. YOON (1990). Human pancreatic islet cell specific 38 kilodalton autoantigen identified by cytomegalovirus-induced monoclonal islet cell antibody. *Diabetologia* **33**: 569-572.
- PAK, C.Y., H. M. EUN, R. G. MCARTHUR i J. W. YOON (1988). Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* **2**: 1-4.
- PARHAM, P. (1988). Immunology: Intolerant secretion in tolerant transgenic mice. *Nature* **333**: 500-503.
- PICARELLA, D. E., A. KRATZ, C. B. LI, N. H. RUDDLE i R. A. FLAVELL (1992). Insulinitis in transgenic mice expressing tumor necrosis factor b (lymphotoxin) in the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:10036-10040.
- POBER, J. S., L. A. LAPIERRE, A. H. STOLPEN, T. A. BROCK, T. A. SPRINGER, W. FIERS, M. P. BEVILAQUA, D. L. MENDRICK i M. A. GIMBRONE (1987). Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1 species. *J. Immunol.* **138**:3319-3324.
- PUJOL-BORRELL, R. i G. F. BOTTAZZO (1988). Puzzling diabetic transgenic mice: a lesson for human type 1 diabetes? *Immunology Today* **9**: 303-306.
- PUJOL-BORRELL, R., T. HANAFUSA, L. CHIOVATO i G. F. BOTTAZZO (1983). Lectin-induced expression of DR antigen on human cultured follicular thyroid cells. *Nature* **303**: 71-73.
- PUJOL-BORRELL, R. i I. TODD (1987a). **Endocrine and other organ-oriented autoimmune disorders**. Inappropriate HLA Class II in autoimmunity: is it a primary phenomenon? (D. Doniach & G. F. Bottazzo, Ed. Ballières's Clinical Immunology and Allergy). **vol. 1**: p. 1-27.
- PUJOL-BORRELL, R., I. TODD, M. DOSHI, G. G. BOTTAZZO, R. SUTTON, D. GRAY, G. R. ADOLF i M. FELDMANN (1987b). HLA class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumor necrosis factor or lymphotoxin. *Nature* **326**: 304-306.
- PUJOL-BORRELL, R., I. TODD, M. DOSHI *et al.* (1986). Differential expression and regulation of MHC products in the endocrine and exocrine cells of the human pancreas. *Clin. Exp. Immunol.* **65**: 128-139.
- REDDY, E. P., M. SANDBERG-WOLLHEIM, R. V. METTUS, P. E. RAY, E. DEFREITAS, H. KOPROWSKI *et al.* (1989). Amplification and molecular cloning of HTLV-I Sequences from DNA of multiple sclerosis patients. *Science* **243**: 529-533.
- ROMAN, L. M., L. F. SIMONS, R. E. HAMMER, J. F. SAMBROOK i M. J. GETHING (1990). The expression of influenza virus hemagglutinin in the pancreatic β cells of transgenic mice results in autoimmune diabetes. *Cell* **61**: 383-396.
- ROTHLEIN, R., E. A. MAINOLFI, M. CZAJKOWSKI i S. D. MARTIN (1991). A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J. Immunol.* **147**: 3788-93.
- SALAMERO, J. i J. CHARRIERE (1985). Syngeneic sensitization of mouse lymphocytes on monolayers of thyroid epithelial cells. VII. Generation of thyroid specific cytotoxic effector cells. *Cel. Immunol.* **91**: 111-118.
- SARVETNICK, N., D. LIGGITT, S. L. PITTS *et al.* (1988). Insulin-Dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon gamma. *Cell* **52**: 773-782.
- SARVETNICK, N., J. SHIZURU, D. LIGGIT, L. MARTIN, B. MCINTIRE, A. GREGORY, T. PARSLOW i T. STEWART (1990). Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta cell expression of interferon-gamma. *Nature* **346**: 844-847.
- SCHONRICH, G., U. KALINKE, F. MOMBURG, M. MALISSEN, A. M. SCHMITT-VERHULST, B. MALISSEN, G. J. HAMERLING i B. ARNOLD (1991). Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* **65**: 293-304.
- SCHWARTZ, R. (1992). Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4 and B& B1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**: 1065-1068.
- SIGNORE, A., A. COOKE, P. POZZILLI, E. BUTCHER, E. SIMPSON i P. C. L. BEVERLEY (1987). Class II, IL-2 receptor positive cells in the pancreas of NOD mice. *Diabetologia* **30**: 902-905.
- SOLDEVILA, G., M. BUSCEMA, V. MARINI, R. SUTTON, R. JAMES, S. R. BLOOM, R. P. ROBERTSON, R. MIRAKIAN, R. PUJOL-BORRELL i G. F. BOTTAZZO (1991). Transfection with SV40 gene of human pancreatic endocrine cells. *J. Autoimmunity* **4**: 381-396.
- SOMOZA, N., F. VARGAS, M. MARTÍ, C. ROURA, M. VIVES, E. F. USAC, G. SOLDEVILA, A. ARIZA, R. BRAGADO, D. JARAQUEMADA i R. PUJOL-BORRELL (1992). Immunohistopathologic and molecular studies on the

- pancreas of a newly diagnosed type-1 diabetic patient. **Diabetologia** **35** (Sup 1): A41.
- SOMOZA, N., F. VARGAS, M. VIVES, L. ALCALDE, J. FERNÁNDEZ, I. CALICO, R. GIRONÉS i R. PUJOL-BORRELL (1993). Islets in type I diabetes: HLA expression in endocrine cells, cytokine profile and search for viral sequences by PCR. **12th International Immunology and diabetes workshop**. Orlando, Florida (USA).
- STEWART, T. A., B. HULTGREN, X. HUANG, J. HULLY i N. J. MACLACHLAN (1993). Alpha-interferon may provide a link between the environment in the immune system in type I diabetes. **12th International Immunology and diabetes workshop**. Orlando, Florida.
- TALAL, N., M. DAUPHINEE, H. DANG, S. ALEXANDER, D. HART i R. GARRY (1990). Detection of serum antibodies to retroviral proteins in patients with primary Sjogren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). **Arthritis Rheum.** **33**: 774-781.
- TARVI, S., Y. TOCHINO i K. NONAKA (1986) **Lessons from the NOD mouse**. Insulinitis and Type I diabetes. Academic Press, Tokio.
- TOCHINO, Y (1986). **Lessons from the NOD mouse**. Discovery and breeding of the NOD mouse. Insulinitis and Type I Diabetes. S. Tarui, Y. Tochino, K. Nonaka (Eds.). Academic Press, Tokio, p. 3-10.
- TODD, J. A., T. J. AITMANN, R. J. CORNALL, S. GHOSH, J. R. S. HALL, C. M. HEARNE, A. M. KNIGHT, J. M. LOVE, M. A. MCALEER, J. B. PRINS, N. RODRIGUES, M. LATHROP, A. PRESSEY, N. H. DELARATO, L. B. PETERSON i L. S. WICKER (1991). Genetic analysis of autoimmune type I diabetes mellitus in mice. **Nature** **351**: 542-547.
- TOKUDA, N., M. KASAHARA i R. B. LEVY (1990). Differential regulation and expression of MHC and Hy6 gene products on mouse testicular Leydig and Sertoli cell line. **J. Autoimmunity** **3**: 457-472.
- TOLOSA, E., C. ROURA, M. MARTÍ *et al.* (1992). Induction of Intercellular Adhesion Molecule-1 but not of Lymphocyte Function-Associated Antigen-3 in thyroid Follicular cells. **J. Autoimmunity** **5**: 119-35.
- VAN-KAER, L., P. G. ASHTON-RICKARDT, H. L. PLOEGH i S. TONEGAWA (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules and CD4-8+ T cells. **Cell** **71**: 1205-1214.
- VAREY, A. M., P. LYDYARD, B. DEAN *et al.* (1988) Interferon-gamma induces Class II MHC antigens on RINm5F cells. **Diabetes** **37**: 209-212.
- VIVES, M., G. SOLDEVILA, L. ALCALDE, C. LORENZO, N. SOMOZA i R. PUJOL-BORRELL (1991). Adhesion molecules in human islet cells: de novo induction of ICAM-1 but not of LFA-3. **Diabetes** **40**: 1382-1390.
- WALKER, R., A. COOKE, A. J. BONE *et al.* (1986). Induction of MHC class II antigen on pancreatic beta cells isolated from BB rats. **Diabetologia** **29**: 749-751.
- WATARU, H., N. LAHAT, M. PLATZER, S. SCHMIDT i T. F. DAVIES (1988). Activation of MHC restricted rat T cells by cloned syngeneic thymocytes. **J. Immunol.**