

Nous conceptes sobre la diabetis autoimmunitària

Joan Verdaguer¹ i Marta Vives-Pi²

¹ Unitat d'Immunologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida i IRBLleida

² Servei d'Immunologia, Institut de Recerca Germans Trias i Pujol

Adreça per a la correspondència: Joan Verdaguer. Unitat d'Immunologia, Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida. C. de Montserrat Roig, 2. 25008 Lleida. Tel.: 973 702 210.

Adreça electrònica: joan.verdaguer@mex.udl.cat.

Marta Vives-Pi. Servei d'Immunologia, Institut de Recerca Germans Trias i Pujol. Ctra. Canyet s/n. 08916 Badalona. Tel.: 934 978 666. Adreça electrònica: mvives@igtp.cat.

DOI: 10.2436/20.1501.02.148

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (electrònic): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 02/02/2014 Acceptat: 15/03/2014

Resum

La diabetis mellitus de tipus 1 (DT1) és una malaltia metabòlica provocada per la destrucció de les cèl·lules productores d'insulina, les cèl·lules β dels illots pancreàtics. De base autoimmunitària, no es coneix l'etiologia d'aquesta malaltia, tot i que s'han identificat factors genètics, ambientals i immunitaris de susceptibilitat. En aquest article fem un repàs dels mecanismes d'autoimmunitat i els nous conceptes en aquest camp. També destaquem els models experimentals utilitzats en l'estudi de la DT1 i les noves teràpies desenvolupades amb aquests. Per acabar, fem una ullada al present i al futur de la immunoteràpia preventiva i de tractament en aquesta malaltia, i insistim en la necessitat d'aturar el procés autoimmunitari, restaurar la tolerància immunitària, identificar nous biomarcadors de progressió i aplicar conjuntament estratègies de regeneració i neogènesi de les cèl·lules β .

Paraules clau: diabetis de tipus 1, autoimmunitat, cèl·lules β , tolerància, immunoteràpia.

Introducció

La diabetis mellitus de tipus 1 (DT1) és una malaltia metabòlica provocada per la destrucció de les cèl·lules productores d'insulina als illots pancreàtics, anomenades cèl·lules β . La diabetis mellitus de tipus 1 es classifica en DT1A, immunomediada, i DT1B, idiopàtica (Atkinson i Maclaren, 1994). La DT1A, a la qual ens referirem en aquest capítol, té etiologia desconeguda però se sap que és la conseqüència d'un atac autoimmunitari. En canvi, la DT1B no mostra evidències d'autoimmunitat.

La diabetis autoimmunitària es diagnostica durant la infància o l'adolescència, però pot aparèixer en l'edat adulta. Abans de les manifestacions clíniques hi ha un període asimptomàtic —prediabetis—, en el qual s'inicia l'autoimmunitat contra els illots. En aquesta etapa apareixen en el sèrum els autoanticossos contra components de cèl·lules dels illots (ICA), antiglutamat-descarboxilasa o GAD (GADA), antiinsulina (IAA) i antiproteïna tirosina-fosfatasa IA-2 (IA-2A).

No es coneix l'etiologia d'aquesta malaltia i quan es diagnostica ja s'han destruït el 80-95 % de cèl·lules β (Atkinson i Maclaren, 1994). Els fenòmens autoimmunitaris inicials no es detecten en part per l'accés difícil al pàncrees. Els coneixements de les alteracions immunitàries que tenen lloc als illots de Langerhans es basen en estudis histopatològics, immunitaris i determinacions moleculars en els pàncrees de necròpsies i autòpsies de pacients diabètics que han mort en diferents etapes de la malaltia. Aquests estudis, que són la font actual de coneixement per comprendre els fenòmens que

New concepts concerning autoimmune diabetes

Summary

Type 1 diabetes (DT1) is a metabolic disease caused by the selective destruction of the insulin producing β cells by the immune system. The etiology of the disease is still unknown, but several genetic, environmental and immunological factors of susceptibility have been identified. In this chapter we describe the autoimmune mechanisms involved in this disease, as well as the experimental models used for the study of DT1 and for the development of new strategies of immune intervention. Lastly, we explain the recent assays in immunotherapies aimed at preventing and curing the disease, based on breaking autoimmune response, restoring immunological tolerance and identifying new biomarkers of disease progression, as well as strategies for regenerating β cells.

Key words: type 1 diabetes, autoimmunity, β cells, tolerance, immunotherapy.

comporta la pèrdua de tolerància immunitària contra components propis *in situ*, es veuen reforçats amb els models experimentals. El més representatiu és sens dubte el model murí no obès diabètic (NOD), que desenvolupa diabetis autoimmunitària espontània semblant a la malaltia humana (Makino *et al.*, 1980).

Autoimmunitat i DT1

Si el sistema immunitari perd la capacitat de tolerar components propis es pot iniciar una resposta autoimmunitària. En el cas de la DT1 aquests autoantígens són principalment molècules dels illots pancreàtics. Aquesta resposta està mitjançada per limfòcits T i B i normalment es produeixen autoanticossos, que reflecteixen l'etiologia autoimmunitària i s'utilitzen com a biomarcadors. Una demostració del paper de l'autoimmunitat és la millora observada en pacients amb malalties autoimmunitàries quan són tractats amb immunosupressors, com la ciclosporina. Una altra demostració del factor immunitari és la transferència de la DT1 a través de limfòcits, que ha estat demostrada en models experimentals i en un cas clínic entre dos germans amb HLA idèntic després d'un transplantament de medulla òssia (Lampeter *et al.*, 1993). Un tercer factor és el fet que els pacients amb DT1 desenvolupen amb més freqüència altres malalties autoimmunitàries (Barker, 2006).

Contra quines molècules va dirigida la resposta autoimmunitària en la DT1? Alguns d'aquests autoantígens, com insulina o IGRP, són exclusius

de cèl·lules β , però d'altres no ho són, com els neuroendocrins (GAD, IA-2, S100 β) o neuronals (GFAP) (Winer *et al.*, 2003). Aquesta resposta es reflecteix en perifèria en forma d'autoanticossos, marcadors de la destrucció de les cèl·lules β i de susceptibilitat, més que un mecanisme efector. Els primers a aparèixer són els antiinsulina (IAA), i la seva prevalença és inversament proporcional a l'edat d'inici clínic. Els autoanticossos anti-GAD (GAD₆₅A) són un bon marcador d'autoimmunitat contra els illots en adults, amb una prevalença del 84 %, mentre que els anti-IA-2 (IA-2A) tenen una prevalença del 70 % (Tsirogianni *et al.*, 2009). Els autoanticossos contra el transportador de zinc ZnT8 en el 60-80 % de pacients amb DT1 també són biomarcadors de la DT1 (Wenzlau *et al.*, 2007).

Immunopatologia de la DT1 en humans

La fase prediabètica de la DT1 és asimptomàtica però probablement és la més interessant des del punt de vista immunitari. Els autoanticossos contra molècules insulars són biomarcadors però no ofereixen cap informació sobre el procés de destrucció de cèl·lules β . Quan un individu és diagnosticat i tractat, la DT1 passa a ser una malaltia crònica. Per tant, hi ha poques dades obtingudes a partir de mostres de pàncrees de pacients, especialment en l'inici clínic de la malaltia. Alguns grups han fet estudis histològics i moleculars de pàncrees de pacients amb DT1 que han mort en diferents etapes de la malaltia, que han revelat importants aspectes de la resposta autoimmunitària als illots (Foulis, 1996; Richardson *et al.*, 2011; Planas *et al.*, 2010).

Una de les característiques que defineixen els illots dels pacients amb DT1 és la infiltració leucocitària —insulitis— d'intensitat lleugera i al voltant i a l'interior dels illots. Aquesta insulitis, en humans, està formada majoritàriament per limfòcits T citotòxics (CD8⁺) i macròfags (Bottazzo *et al.*, 1985; Foulis, 1986; Hänninen *et al.*, 1992; Somoza *et al.*, 1994). També hi ha limfòcits T CD4⁺, limfòcits B i cèl·lules dendrítiques, tot i que aquestes sembla que dominen en etapes inicials de l'autoimmunitat. Els estudis immunohistològics i de biologia molecular en els pàncrees de pacients diabètics revelen també una disminució important d'expressió d'autoantígens a causa de la desaparició de la massa β . Les cèl·lules endocrines expressen nivells elevats de molècules de presentació antigènica com HLA de classe I, i ocasionalment HLA de classe II. En els illots pancreàtics i endotelis s'ha observat també hiperexpressió de molècules d'adhesió, citocines proinflamàtores i interferons, així com de Fas —en les cèl·lules endocrines— i de lligand de Fas —en els leucòcits infiltrants. El panorama que es dibuixa és el d'un atac força selectiu de cèl·lules de la resposta immunitària innata i adquirida, amb components proinflamatoris, citocines i quimiocines. Aquest tipus d'estudis s'amplien actualment gràcies a una iniciativa internacional de distribuir teixits de pacients i d'individus prediabètics (amb autoanticossos). D'aquesta manera s'han demostrat alguns mecanismes d'autoreactivitat postulats després d'observacions immunohistològiques (Coppeters *et al.*, 2012; Penaranda *et al.*, 2010; Spencer i Peakman, 2009).

Els estudis immunohistològics, de gran importància en la comprensió de l'autoimmunitat de la cèl·lula β , no ofereixen una visió global del desenvolupament del procés. Anàlisis moleculars amb la metodologia de microxips permeten identificar el transcriptoma de pàncrees de pacients diabètics (Planas *et al.*, 2010). El transcriptoma dels pàncrees de pacients diabètics revela que el procés autoimmunitari és crònic i s'observa des de l'inici clínic de la malaltia fins a molts anys després. Això implica que els processos d'atac i de regeneració persisteixen en el temps i es retroalimenten. Les vies funcionals alterades confirmen la contribució de gens de les diverses categories de la resposta immunitària, prèviament identificats en els estudis immunohistològics, com són les vies de presentació antigènica, adhesió, quimiotaxi, inflamació, immunitat natural, resposta humoral, immunoregulació, repara-

ció i regeneració. La hiperexpressió de gens d'immunoregulació i regeneració probablement forma part del mecanisme d'intent de restaurar les cèl·lules β perdudes. La balança es decanta, però, envers la destrucció, tot i que es van produir noves cèl·lules β durant tot el procés (Meier *et al.*, 2005). La neogènesi de cèl·lules β suposaria una nova font d'autoantígens que cronificaria l'autoimmunitat, en concordança amb la hipòtesi que descriu la DT1 com un procés remitent-recurrent (Herrath *et al.*, 2007). Seria útil disposar de la mateixa informació en pàncrees d'individus prediabètics, en diferents moments crítics de la història natural de la malaltia, com ara l'inici de la pèrdua de tolerància immunitària envers la cèl·lula β i el moment d'aparició dels autoanticossos. Així se sabrien els factors determinants en cada moment i també si hi ha individus que superen l'autoimmunitat i la reverteixen mitjançant un restabliment natural de la tolerància perifèrica, evitant la malaltia.

Una altra línia d'investigació en pàncrees de pacients amb DT1 ha estat la recerca de virus o de l'empremta d'infeccions víriques com a desencadenant de la malaltia. Les infeccions víriques podrien ser un factor ambiental, juntament amb la susceptibilitat genètica, implicats en la malaltia. Podrien actuar mitjançant mimetisme molecular, i augmentar el processament i presentació d'autoantígens insulars durant la infecció, disseminant epítops o amb anticossos antiidiotípics. Estudis epidemiològics, serològics i experimentals suggereixen l'associació entre virus de la rubèola, enterovirus i citomegalovirus amb DT1. Les proves indirectes o empremtes víriques són molt difícils de detectar després de l'inici clínic de la DT1. Es va demostrar la presència de l'enterovirus Coxsackie B4 en el pàncrees de pacients amb DT1 (Dotta *et al.*, 2007). El transcriptoma de pàncrees de pacients amb DT1 mostra alteracions compatibles amb una infecció vírica en illots: transcrits de citocines de resposta antivírica, de gens d'immunitat natural i de resposta a IFN. Hi ha molts estudis epidemiològics en marxa, però malgrat alguns resultats que relacionen virus amb DT1 (Stene i Rewers, 2012), els efectes causals directes són difícils de verificar i caldrien estudis més amplis (Christen *et al.*, 2012).

La identificació dels processos i dels gens implicats en l'inici, progressió i regeneració en la DT1 en el teixit diana podrien contribuir al disseny d'immunoteràpies per frenar l'autoimmunitat i facilitar l'èxit de la medicina regenerativa en la DT1.

Models experimentals en la DT1

Els models animals han estat importantíssims per al coneixement i tractament de la DT1. Així, a principis del segle xx, els canadencs Frederick Grant Banting, Charles Best, James Collip, i J. J. R. Macleod, de la Universitat de Toronto, van descobrir la funció de la insulina gràcies als treballs experimentals fets en gossos pancreatectomitzats (Banting *et al.*, 1922), la qual cosa els va merèixer el premi Nobel de Medicina l'any 1923. Fins als anys cinquanta la utilització de models de diabetis «induïda quirúrgicament» en diferents models animals va ser clau per al coneixement anatòmic i fisiològic del pàncrees endocrí.

Més endavant (Junod *et al.*, 1969) es van desenvolupar tècniques experimentals d'inducció d'hiperglucèmia amb toxines selectives com l'estrepto-zotocina. Així es va observar que, en ratolins, dosis altes d'estrepto-zotocina produïen la destrucció de les cèl·lules β a través d'un efecte tòxic massiu i directe, i d'aquesta manera es presentava una hiperglucèmia en pocs dies, mentre que l'administració de petites dosis consecutives induïa una infiltració leucocitària a escala insular, la qual va estar i ha estat objecte d'estudi de les possibles vies d'inducció de la mort cel·lular de les cèl·lules β pancreàtiques. Van ser, per tant, models fonamentals en l'estudi de la hiperglucèmia, les seves complicacions, i el desenvolupament de nous tractaments farmacològics. De fet, els models de diabetis induïda amb estrepto-zotocina en rata van ser la base del desenvolupament dels trasplantaments d'illots. Amb tot, no es considera

un bon model de DT1 perquè la malaltia no és espontània ni de cap manera produïda per una resposta immunitària, tal com succeeix en la DT1 humana.

A principis dels anys vuitanta diferents grups d'investigadors, amb l'objectiu d'obtenir millors models de diabetis autoimmunitària, van derivar línies de rosegadors consanguinis que desenvolupaven espontàniament diabetis. D'aquesta manera es va generar, d'una banda, la soca de ratolí NOD (*non-obese diabetic*) (Makino *et al.*, 1980), i de l'altra la soca de rata BB (Nakhooda *et al.*, 1977). Des de llavors aquests models, i en especial el ratolí NOD, han estat la base per a l'estudi de l'etiopatogènia de la DT1.

El ratolí NOD. Variants transgèniques i genoanul·lats

Des de la descripció als anys vuitanta, la soca murina NOD ha estat àmpliament utilitzada en l'estudi de la DT1. Com en els humans, en aquests ratolins la malaltia es presenta espontàniament, amb presència de cèl·lules T autoreactives, i anticossos antiillot (Atkinson i Leiter, 1999). Aquest model desenvolupa també una resposta autoimmunitària contra altres òrgans com les glàndules salivals, tiroïdes, sistema nerviós i pròstata, i fa palès que, igual que en el cas d'alguns pacients amb DT1, hi ha un defecte en la tolerància del sistema immunitari. En aquests ratolins la infiltració leucocitària en els illots s'inicia a partir de les tres setmanes d'edat però no és fins a partir de les dotze setmanes que la malaltia es manifesta. Malgrat que és una soca congènita, en què tots els individus són genèticament idèntics, no tots pateixen DT1, encara que sí insulinitis. Aproximadament el 80 % de les femelles i un 20-40 % dels mascles presenten DT1, fet que denota la importància dels factors ambientals i estocàstics (Pozzilli *et al.*, 1993). Aquest model experimental és fonamental en la investigació en DT1, tant per a la identificació dels gens de resistència/susceptibilitat a la malaltia, i dels factors endògens i ambientals que en modulen l'aparició, com també dels mecanismes immunitaris implicats i dels autoantígens contra els quals es dirigeix la resposta. D'altra banda, els ratolins NOD han estat objecte de nombrosos estudis sobre noves teràpies preventives o terapèutiques, especialment mitjançant la utilització d'agents immunomoduladors.

Els factors ambientals. Pel que fa als factors ambientals, s'ha determinat que són clau perquè la malaltia es desenvolupi. S'ha observat que en condicions ambientals controlades entre 18 i 20 °C de temperatura, lliures de patògens oportunistes SPF (*specific pathogen free*), i amb dietes riques amb fibres vegetals (riques en gluten), la incidència de la malaltia és molt alta. Al contrari, en estabulacions convencionals en què els animals entren en contacte amb diferents microorganismes, la incidència de la malaltia pot arribar a ser zero (Pozzilli *et al.*, 1993; Todd i Wicker, 2001; Forlenza i Rewers, 2011). Aquest fet donaria suport a la hipòtesi de la higiene, en la qual es considera que la manca de contacte amb patògens i paràsits, i la manca d'una flora microbiana «normal», induiria a una mala resposta del sistema immunitari.

Els factors genètics. La susceptibilitat genètica a la malaltia té moltes similituds entre humans i el model NOD (Rich *et al.*, 2006; Wicker, 2005; Santamaria, 2010). S'han identificat múltiples locus implicats en la malaltia. El principal locus de susceptibilitat a la DT1 es troba en els gens que codifiquen les molècules de l'MHC: la presència d'un aminoàcid serina en la posició 57 de la cadena I-A β en el ratolí, i també en la cadena DQ β en humans, origina un al·lel que confereix susceptibilitat a la malaltia, mentre que un aminoàcid aspàrtic en aquesta posició confereix resistència. Aquesta homologia estructural entre els al·lells de susceptibilitat corresponents a les molècules de MHC de classe II, IDDM1 en humans (DQ8) i Idd1 en ratolí (I-A^{B7}) suggereix defectes en els processos de presentació antigènica en la DT1. La presència d'aquest al·lel és essencial però no suficient perquè es desenvolupi la malaltia. Així, tant en el ratolí NOD com en humans s'ha descrit la participació d'altres locus de susceptibilitat associats a gens d'homeòstasi de la resposta immunitària, de

tolerància o immunoregulació, o de la fisiologia de la cèl·lula β . S'han descrit una vintena de *Idd* i IDDM en el ratolí NOD i en humans, respectivament, encara que no tots han coincidit en ambdues espècies. Dins d'aquests locus s'ha observat una clara associació en humans del locus IDDM2 i IDDM12 amb el gen de la insulina i de la molècula CTLA-4, respectivament, mentre que en el ratolí NOD l'associació s'ha establert entre el locus Idd5.1 i el gen de CTLA-4, i una possible associació entre els gens de NRAMPI i de IL-2 o IL-21 amb els locus *Idd5.2* i *Idd3*, respectivament. Tots aquests són gens implicats en la resposta immunitària. De fet, el ratolí NOD presenta diverses «peculiaritats» en el seu sistema immunitari: deficiències en la capacitat coestimuladora de les cèl·lules presentadores d'antigen, disminució del nombre i funció de les cèl·lules NKT i T CD4+CD25+ amb funció reguladora, limfopènia, i defectes en la senyalització a través del TCR. Aquest conjunt de factors, a més d'altres defectes pel que fa al timus, causen un defecte de la tolerància central i perifèrica en aquests animals.

Patogènia de la DT1. La patogènia de la DT1 en ratolins NOD ha estat àmpliament estudiada, i s'ha descobert que són els limfòcits T els responsables de la destrucció de les cèl·lules β , però també que altres cèl·lules del sistema immunitari com les cèl·lules dendrítiques, els macròfags i els limfòcits B hi tenen un paper rellevant com a cèl·lules presentadores d'antigen (APC) (Santamaria, 2010). Dintre de la població de limfòcits T s'ha descobert que ambdues poblacions, CD4+ i CD8+, són necessàries perquè es produeixi la malaltia (Bendelac *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1988; Yagi *et al.*, 1992; Christianson *et al.*, 1993; Haskins i McDuffie, 1990; Bradley *et al.*, 1992). En la fase inicial de la malaltia serien els limfòcits T CD8+ els que iniciarien l'atac a les cèl·lules β , però aquests limfòcits T CD8+ necessiten la col·laboració de limfòcits T CD4+. Diferents estudis apunten que la captació més primerenca d'autoantígens procedents de cèl·lules β , d'APC dels illots, es faria a partir de les dues setmanes d'edat coincidint amb apoptosi massiva de cèl·lules β i cèl·lules del sistema nerviós perifèric implicades en la innervació de l'illot (Tsui *et al.*, 2007; Saravia-Fernandez *et al.*, 1996). Aquestes APC s'activarien i migrarien als ganglis, on presentarien els autoantígens a limfòcits T autoreactius. Els limfòcits T CD8+ citotòxics migrarien als illots i iniciarien la destrucció de les cèl·lules β . En una segona fase, els autoantígens alliberats en el primer atac serien captats, processats i presentats per APC a limfòcits T CD4+ col·laboradors i citolítics, que juntament amb els limfòcits T CD8+ infiltrarien els illots, i continuarien la destrucció de la massa β .

Pel que fa als limfòcits B, també sembla que tenen un paper important en la resposta autoimmunitària. D'una banda, els ratolins NOD deficients en limfòcits B no desenvolupen DT1 (Serreze *et al.*, 1996). D'altra banda, els limfòcits B autoreactius contra cèl·lula β es diferenciarien en cèl·lules productores d'autoanticossos contra autoantígens (Pietropaolo i Eisenbarth, 2001; Bonifacio *et al.*, 2001). A més d'orientar el diagnòstic, la detecció d'aquests autoanticossos s'utilitza per a la detecció precoç de la malaltia en pacients d'alt risc, ja que apareixen en la fase preclínica. Se'n desconeix en bona part la implicació en la malaltia però se sospita que tenen activitat diabetogènica, ja que estudis en ratolins NOD han demostrat que la transferència d'autoanticossos a través de la placenta afavoreix el desenvolupament de la DT1 (Greeley *et al.*, 2002).

Autoantígens en NOD. Un punt clau és la recerca dels autoantígens contra els quals es dirigeix aquest atac. Se sap que durant el procés subclínic es produeix una expansió en la diversitat de limfòcits T i B autoreactius (Lieberman i DiLorenzo, 2003), ja que amb la destrucció de les cèl·lules β s'alliberen nous autoantígens (*antigenic spreading*). S'han aïllat clons de limfòcits T autoreactius procedents d'insulinitis incipients, i se n'ha estudiat l'especificitat i el comportament quan el seu TCR és àmpliament expressat de manera transgènica. Aquests estudis assenyalen la insulina i la IGRP com a autoantígens inicials

en la DT1 (Santamaria, 2010). A més, el comportament d'aquests limfòcits T autoreactius depèn en bona mesura de l'afinitat del TCR, i són més dependents de coestimuls aquells limfòcits en els quals el seu TCR té menys afinitat per l'autoantigen.

Models derivats del NOD. S'han generat models de ratolí NOD transgènics i genoanul·lats, i també d'estudis basats en el bloqueig selectiu d'alguna molècula mitjançant l'administració d'anticossos monoclonals, per analitzar en profunditat el paper de diverses molècules implicades en la coestimulació dels limfòcits T en la DT1 (Wong *et al.*, 1998; Salomon *et al.*, 2001; Stumpf *et al.*, 2013; Meagher *et al.*, 2008). La interpretació dels resultats obtinguts en aquests models no sempre és senzilla, ja que de vegades les mateixes vies d'activació dels limfòcits T efectors són també compartides per poblacions de limfòcits T reguladors. De la mateixa manera, aquestes tècniques s'han utilitzat també en l'estudi de citocines i quimiocines implicades en l'activació o supressió de la resposta autoimmunitària (Rabinovitch, 1998). Però sovint la informació obtinguda en aquests estudis no és conclouent, i de vegades contradictòria, com per exemple que l'efecte observat en un animal deficient per a un determinat element no és contrari al que s'observa quan se sobreexpressa aquest mateix element transgènicament, com caldria esperar. Aquest efecte és degut al fet que, sovint, els mecanismes de la resposta immunitària són redundants, i algunes citocines poden tenir efectes diferents si són expressades sistèmicament o localment.

Paper de la cèl·lula β . La funcionalitat de les cèl·lules β és decisiva en la patogènesi de la DT1 (Pirot *et al.*, 2008; Faideau *et al.*, 2005; Rosmalen *et al.*, 2002; Saravia i Homo-Delarche, 2003). Així, s'han assenyalat com a causes del procés autoimmunitari la disfunció i l'increment en la mort de cèl·lules β en el moment que finalitza l'etapa d'al·letament. També s'ha relacionat un increment de l'activitat funcional de les cèl·lules β amb un augment de la incidència de la malaltia. Així, en ratolins NOD, el tractament preventiu amb insulina, que redueix l'activitat funcional β , disminueix la incidència de DT1. Aquests resultats suggereixen que un increment de l'activitat de la cèl·lula β pot portar-la a un procés d'estrès, i induir: 1) increment de la presentació antigènica; 2) producció de nous autoantígens, i 3) increment de la mort de les cèl·lules β i alliberament de senyals de perill. S'ha descrit que les cèl·lules β són constitutivament més sensibles a les citocines proinflamàtores. Tot això fa suposar que en ratolins NOD les possibilitats de presentació d'autoantígens insulars de cèl·lules APC a limfòcits T amb especificitat per cèl·lules β és més gran que en altres soques.

La rata BB

La rata BB (*biobreding diabetes-prone rat*) es va originar el 1983 mitjançant la selecció de rates amb hiperglucèmia en una colònia de rates Wistar (Nakhoda *et al.*, 1977; Mordes *et al.*, 1987). A diferència del model NOD, la incidència de DT1 és semblant en mascles i femelles (igual que succeeix en els humans) i pot arribar a ser del 90 % si els animals són estabulats en condicions lliures de patògens. La DT1 es presenta a les 10-16 setmanes de vida, però la fase preclínica d'insulitis és de tan sols dues setmanes.

També en aquest model s'ha analitzat la susceptibilitat genètica a la DT1. Fins ara s'han descrit cinc locus de susceptibilitat (*iddm*) (Trucco, 2009; Wallis *et al.*, 2009). Una vegada més, s'ha observat que la regió gènica on es troben els gens del MHC està estretament lligada amb la susceptibilitat a la malaltia (*iddm1*). No obstant això, una peculiaritat de la rata BB és el locus *iddm2*, on es troba el gen *lyp*, que és indispensable per al desenvolupament de la diabetis en aquest model. La soca BB és homozigota per a la mutació *lyp*, que origina una acusada limfopènia caracteritzada per una important reducció del nombre de limfòcits T CD4+ i per l'absència pràcticament total de limfòcits T CD8+ en sang perifèrica. No obstant això, la destrucció de les cèl·lules β en aquest model també la porten també a terme els limfòcits T CD4+ i CD8+.

S'ha descrit que la mutació *lyp* provoca un important increment en la taxa d'apoptosi dels limfòcits T madurs tant abans de sortir del timus com després, una vegada són activats. Sembla que els pocs limfòcits T de memòria que queden circulant són rescatats de l'apoptosi si són estimulats via antigen; en conseqüència, el contacte amb autoantígens produiria una hiperexpansió clonal dels limfòcits T autoreactius. Paral·lelament, altres defectes a escala de timus, cèl·lules dendrítiques, cèl·lules T reguladores i cèl·lules NK contribueixen també als defectes de tolerància central i perifèrica en aquest model.

Altres models de DT1

L'any 1991 es va descriure el model de rata LETL (Long Evans Tokushima Lean) com a model animal de DT1 (Kawano *et al.*, 1991). Aquest cas, com en els altres precedents, va ser el resultat de la selecció d'una línia d'animals diabètics. Aquests animals també desenvolupen espontàniament DT1, sense biaix de gènere, i sense limfopènia. També presenten un component genètic poligènic, amb una forta contribució de l'haplotip de MHC, que és el mateix que el de la rata BB.

També es va descriure el model de rata LEW.IAR1/Ztm-iddm (Lenzen *et al.*, 2001). Encara que només un 20 % dels animals d'aquesta soca desenvolupen DT1, és remarcable que la resta d'animals ni tan sols desenvolupen insulitis. La infiltració d'aquests animals està predominantment formada per cèl·lules T CD8+. Aquests dos aspectes són interessants, ja que també s'observen en pacients de DT1. De fet, en humans no s'ha observat la insulitis «benigna» que s'ha descrit en les soques murines resistents (per exemple, la soca de ratolí NOR) o en la fracció d'individus resistents que trobem en la soca de ratolí NOD (per exemple, mascles) que desenvolupen una insulitis no destructiva.

Cal remarcar que també s'estudia la DT1 en animals domèstics, com gossos i gats; en aquest cas, però, no únicament com a models experimentals, sinó com a malaltia en el camp de la veterinària (Mattheeuws *et al.*, 1984; Rand *et al.*, 2004).

Estudis experimentals en prevenció i tractament

Nombroses estratègies s'han aplicat com a immunoteràpies experimentals en DT1, entre d'altres l'administració de citocines, la immunització amb autoantígens, el tractament amb anticossos monoclonals i l'expansió de poblacions limfocitàries de tipus regulador. Molts d'aquests tractaments han aconseguit, en el model NOD, prevenir la malaltia, retardar-ne l'aparició, i fins i tot en alguns cassos han revertit la DT1 (Shoda *et al.*, 2005). En humans, els assajos clínics derivats d'aquestes teràpies experimentals no han estat tan positius i de moment no s'ha aconseguit revertir la malaltia, tot i que alguns assajos aconsegueixen incrementar la producció d'insulina endògena, símptoma de recuperació de les cèl·lules β i de disminució de l'autoimmunitat (Herold *et al.*, 2013). Destaquem a continuació tres immunoteràpies experimentals en el ratolí NOD.

Una és la teràpia amb anticossos monoclonals anti-CD3. L'administració d'anticossos anti-CD3 a ratolins NOD diabètics induïx una remissió completa de la malaltia i la restauració de la tolerància (Chatenoud *et al.*, 1994). A principis de l'any 2000 es van iniciar dos assajos clínics amb anticossos contra CD3 humà. Es va demostrar la preservació de la massa β , i es mantenien nivells de secreció d'insulina endògena significativament elevats i menys requisits d'insulina endògena fins a divuit mesos després del tractament. Tot i l'aparició d'efectes secundaris, hi ha un efecte positiu remarcable (Keymeulen *et al.*, 2010).

Una altra estratègia és la basada en l'administració de cèl·lules dendrítiques (CD). Les CD són les primeres cèl·lules que infiltren l'illot en el NOD (Morel *et al.*, 1999) i activen els limfòcits T autoreactius a través de la presen-

tació d'autoantígens. La immunoteràpia amb les anomenades CD tolerogèniques, que fan una presentació no inductora de la resposta autoimmunitària, disminueix la incidència de la DT1 (Feili-Hariri *et al.*, 1999). Altres protocols de vacunació experimental es basen en l'ús de cèl·lules dendrítiques amb deficiències moleculars per al procés de presentació antigènica, com CD40 (Machen *et al.*, 2004) o bé polsades amb cèl·lules β apoptòtiques (Marin-Gallen *et al.*, 2010; Pujol-Autonell *et al.*, 2013). Aquestes estratègies redueixen la incidència si s'apliquen en la fase prediabètica. En els darrers anys s'han perfeccionat els protocols per obtenir CD humanes amb vista a una futura translacionalitat (Giannoukakis i Trucco, 2012).

Finalment, cal destacar l'anomenada *nanovacuna*, una estratègia basada en els mecanismes reguladors per evitar la destrucció de les cèl·lules β (Tsai *et al.*, 2010). La vacuna consisteix en nanopartícules de ferro cobertes de molècules de MHC de classe I que presenten pèptids autoantigènics específics per a la DT1. La vacuna funciona a escala preventiva però també curativa en ratolins NOD diabètics.

Evidentment, la translació de la investigació en DT1 experimental a humans ha de tenir en compte les limitacions del model murí i les seves diferències a escala de sistema immunitari (Mestas i Hughes, 2004).

Present i futur de la immunoteràpia en diabetis de tipus 1

Nombroses immunointervencions han estat aplicades en assajos clínics per prevenir o revertir la DT1 (Peakman, 2010). Les estratègies han estat basades en molècules bloquejadores de la resposta immunitària (anticossos, majoritàriament) o bé específiques d'antigen (administració d'autoantígens), o basades en teràpies cel·lulars, o combinacions de dues o més estratègies.

Bibliografia

- ATKINSON, M. A.; MACLAREN, N. K. (1994). «The pathogenesis of insulin dependent diabetes». *N. Engl. J. Med.*, 331: 1428-1436.
- ATKINSON, M.; LEITER, E. H. (1999). «The NOD mouse model of insulin dependent diabetes: As good as it gets?». *Nat. Med.*, 5: 601-604.
- BANTING, F. G. [et al.] (1922). «Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report». *CMAJ*, 12: 141-146.
- BARKER, J. M. (2006). «Type 1 diabetes associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening». *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91: 1210-1217.
- BENDELAC, A. [et al.] (1987). «Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells». *J. Exp. Med.*, 166: 823-832.
- BONIFACIO, E. [et al.] (2001). «International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice». *Diabetes*, 50: 2451-2458.
- BOTTAZZO, G. F. [et al.] (1985). «In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis». *N. Engl. J. Med.*, 313: 353-360.
- BRADLEY, B. [et al.] (1992). «CD8 T cells are not required for islet destruction induced by a CD4+ islet-specific T-cell clone». *Diabetes*, 41: 1603-1608.
- CHATENOUD, L. [et al.] (1994). «Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 123-127.
- CHRISTEN, U. [et al.] (2012). «Infection as a cause of type 1 diabetes?». *Curr. Opin. Rheumatol.*, 24: 417-423.
- CHRISTIANSON, S. [et al.] (1993). «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*, 42: 44-55.
- COPPIETERS, K. T. [et al.] (2012). «Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitis lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients». *J. Exp. Med.*, 209: 51-60.
- DOTTA, F. [et al.] (2007). «Coxsackie B4 virus infection of β cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 5115-5120.
- FAIDEAU, B. [et al.] (2005). «Role of β -cells in type 1 diabetes pathogenesis». *Diabetes*, 54 (supl. 2): S87-S96.
- FEILI-HARIRI, M. [et al.] (1999). «Immunotherapy of NOD mice with bone marrow-derived dendritic cells». *Diabetes*, 48: 2300-2308.
- FEUTREN, G.; MIHATSCH, M. J. (1992). «Risk factors for cyclosporine-induced nephropathy in patients with autoimmune diseases. International kidney biopsy registry of cyclosporine in autoimmune diseases». *N. Engl. J. Med.*, 326: 1693-1695.
- FORLENZA, G. P.; REWERS, M. (2011). «The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us?». *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 18: 248-251.
- FOULIS, A. K. (1996). «The pathology of the endocrine pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus». *APMIS*, 104: 161-167.
- FOULIS, A. K.; FARQUHARSON, M. A. (1986). «Aberrant expression of HLA-DR antigens by insulin-containing β -cells in recent-onset type 1 diabetes mellitus». *Diabetes*, 35: 1215-1224.
- GIANNOUKAKIS, N.; TRUCCO, M. (2012). «Dendritic cell therapy for Type 1 diabetes suppression». *Immunotherapy*, 4: 1063-1074.
- GREELEY, S. A. [et al.] (2002). «Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice». *Nat. Med.*, 8: 399-402.
- HÄNNINEN, A. [et al.] (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.
- HASKINS, K.; MCDUFFIE, M. (1990). «Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone». *Science*, 249: 1433-1436.
- HEROLD, K. C. [et al.] (2013). «Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes». *Nat. Rev. Immunol.*, 13: 243-256.
- HERRATH, M. G. von [et al.] (2007). «Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease?». *Nat. Rev. Immunol.*, 7: 988-994.
- JUNOD, A. [et al.] (1969). «Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response». *J. Clin. Invest.*, 48: 2129-2139.
- KAWANO, K. [et al.] (1991). «New inbred strain of Long-Evans Tokushima lean rats with IDDM without lymphopenia». *Diabetes*, 40: 1375-1381.
- KEYMEULEN, B. [et al.] (2010). «Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual β cell mass». *Diabetologia*, 53: 614-623.
- LAMPETER, E. F. [et al.] (1993). «Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation». *Lancet*, 341: 1243-1244.
- LENZEN, S. [et al.] (2001). «The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus». *Diabetologia*, 44: 1189-1196.
- LIEBERMAN, S. M.; DILorenzo, T. P. (2003). «A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes». *Tissue Antigens*, 62: 359-377.
- MACHEN, J. [et al.] (2004). «Antisense oligonucleotides down-regulating costimulation confer diabetes-preventive properties to nonobese diabetic mouse dendritic cells». *J. Immunol.*, 173: 4331-4341.
- MAKINO, S. [et al.] (1980). «Breeding of a non-obese diabetic strain of mice». *Exp. Anim.*, 29: 1-13.
- MARIN-GALLEN, S. [et al.] (2010). «Dendritic cells pulsed with antigen-specific apoptotic bodies prevent experimental type 1 diabetes». *Clin. Exp. Immunol.*, 160: 207-214.

- MATTHEEUWS, D. [et al.] (1984). «Diabetes mellitus in dogs: relationship of obesity to glucose tolerance and insulin response». *Am. J. Vet. Res.*, 45: 98-103.
- MEAGHER, C. [et al.] (2008). «Spontaneous development of a pancreatic exocrine disease in CD28-deficient NOD mice». *J. Immunol.*, 180: 7793-7803.
- MEIER, J. J. [et al.] (2005). «Sustained β cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration?». *Diabetologia*, 48: 2221-2228.
- MESTAS, J.; HUGHES, C. C. (2004). «Of mice and not men: differences between mouse and human immunology». *J. Immunol.* 172: 2731-2789.
- MILLER, B. J. [et al.] (1988). «Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice». *J. Immunol.*, 140: 52-58.
- MORDES, J. P. [et al.] (1987). «The BB rat». *Diabetes Metab. Rev.*, 3: 725-750.
- MOREL, P. A. [et al.] (1999). «Immunobiology of DC in NOD mice». *J. Leukoc. Biol.*, 66: 276-280.
- NAKHOODA, A. F. [et al.] (1977). «The spontaneously diabetic wistar rat. Metabolic and morphological studies». *Diabetes*, 26: 100-112.
- PEAKMAN, M. (2010). «Can we vaccinate against Tpe 1 diabetes?». *F1000Reports Biology*, 4: 19.
- PENARANDA, C. [et al.] (2010). «Prevention of diabetes by FTY720-mediated stabilization of peri-islet tertiary lymphoid organs». *Diabetes*, 59: 1461-1468.
- PIETROPAOLO, M.; EISENBARTH, G. S. (2001). «Autoantibodies in human diabetes». A: Her-rath, M. von (ed.). *Current directions in autoimmunity* (1a ed.). Basilea: Karger, vol. 4, p. 252-282.
- PIROT, P. [et al.] (2008). «Mediators and mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 diabetes». *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, 52: 156-165.
- PLANAS, R. [et al.] (2010a). «Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in long-standing diabetes». *Clin. Exp. Immunol.*, 159: 23-44.
- (2010b). «Global gene expression changes in type 1 diabetes: insights into autoimmune response in the target organ and in the periphery». *Immunol. Lett.*, 133: 55-61.
- POZZILLI, P. [et al.] (1993). «NOD mouse colonies around the world-recent facts and figures». *Immunol. Today*, 14: 193-196.
- PUJOL-AUTONELL, I. [et al.] (2013) «Efferocytosis promotes suppressive effects in dendritic cells through prostaglandin E2 production in the context of autoimmunity». *PLOS ONE*, 8: e63296.
- RABINOVITCH, A. (1998). «An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus». *Diabetes Metab. Rev.*, 14: 129-151.
- RAND, J. S. [et al.] (2004). «Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture?». *J. Nutr.*, 134 (8, supl.): 2072S-2080S.
- RICH, S. S. [et al.] (2006). «The Type 1 Diabetes Genetics Consortium». *Ann. NY Acad. Sci.*, 1079: 1-8.
- RICHARDSON, S. J. [et al.] (2011). «Immunopathology of the human pancreas in type-I diabetes». *Semin. Immunopathol.*, 33: 9-21
- ROSMALEN, J. G. [et al.] (2002). «Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes». *Trends Endocrinol. Metab.*, 13: 209-214.
- SALOMON, B. [et al.] (2001). «Development of spontaneous autoimmune peripheral poly-neuropathy in B7-2-deficient NOD mice». *J. Exp. Med.* 194: 677-684.
- SANTAMARIA, P. (2010). «The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes». *Immunity*, 32: 437-445.
- SARAVIA, F.; HOMO-DELARCHE, F. (2003). «Is innervation an early target in autoimmune diabetes?». *Trends Immunol.*, 24: 574-579.
- SARAVIA-FERNANDEZ, F. [et al.] (1996). «Localization of gamma-aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase in the pancreas of the nonobese diabetic mouse». *Endocrinology*, 137: 3497-3506.
- SERREZE, D. V. [et al.] (1996). «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.*, 184: 2049-2053.
- SHODA, L. K. [et al.] (2005). «A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation». *Immunity*, 23: 115-126.
- SOMOZA, N. [et al.] (1994). «Pancreas in recent onset IDDM: changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor Vb usage and cytokine profile». *J. Immunol.*, 153: 1360-1377.
- SPENCER, J.; PEAKMAN, M. (2009). «Post-mortem analysis of islet pathology in type 1 diabetes illuminates the life and death of the β cell». *Clin. Exp. Immunol.*, 155: 125-127.
- STENE, L. C.; REWERS, M. (2012). «Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies». *Clin. Exp. Immunol.*, 168: 12-23.
- STUMPF, M. [et al.] (2013). «The B7-independent isoform of CTLA-4 functions to regulate autoimmune diabetes». *J. Immunol.*, 190: 961-969.
- TODD, J. A.; WICKER, L. S. (2001). «Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models». *Immunity*, 15: 387-395.
- TRUCCO, M. (2009). «Gene-environment interaction in type 1 diabetes mellitus». *Endocrinol. Nutr.*, 56 (supl. 4): 56-59.
- TSAI, S. [et al.] (2010). «Reversal of autoimmunity by boosting memory-like autoregulatory T cells». *Immunity*, 32: 568-580.
- TSIROGIANNI, A. [et al.] (2009). «Specificity of islet cell autoantibodies and coexistence with other organ specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus». *Autoimm. Rev.*, 8: 687-691.
- TSUI, H. [et al.] (2007). «Sensing autoimmunity in type 1 diabetes». *Trends. Mol. Med.*, 13: 405-413.
- WALLIS, R. H. [et al.] (2009). «Type 1 diabetes in the BB rat: a polygenic disease». *Diabetes*, 58: 1007-1017.
- WENZLAU, J. M. [et al.] (2007). «The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 17040-17045.
- WICKER, L. S. (2005). «Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice». *J. Autoimmun.*, 25 (supl.): 29-33.
- WINER, S. [et al.] (2003). «Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not β -cell exclusive». *Nat. Med.*, 9: 198-205.
- WONG, F. S. [et al.] (1998). «The role of lymphocyte subsets in accelerated diabetes in non-obese diabetic-rat insulin promoter-B7-1 (NOD-RIP-B7-1) mice». *J. Exp. Med.*, 187: 1985-1993.
- YAGI, H. [et al.] (1992). «Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice». *Eur. J. Immunol.*, 22: 2387-2393.