

# **Efecto de la hiperactividad de la cdk4 en la fisiología del islote pancreático y en el desarrollo de la diabetes autoinmune**

Tesis doctoral presentada por  
**NÚRIA MARZO ADAM**  
para optar al grado de Doctora en Bioquímica  
Laboratorio Experimental de Diabetes. IDIBAPS

Directores :  
Dra. Concepció Mora Giral  
Dr. Ramon Gomis de Barbarà

Programa de doctorado Biología y Patología Celulares del  
Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica.

Bienio 2001-2003

Tutor: Dr. Carles Enrich



UNIVERSITAT DE BARCELONA



# **I.-Introducción**



## 1 La Cdk4 y el ciclo celular

En las células eucariotas el crecimiento celular, la replicación del material genético y la división celular ocurren conforme a una serie de eventos finamente regulados. Las células somáticas proliferan para permitir el crecimiento de los tejidos y de los organismos en general y para reemplazar el tejido y las células dañadas. La proliferación es también esencial en los mecanismos celulares relacionados con la inmunidad, la inflamación, la hematopoyesis y otras respuestas biológicas, así como en procesos patológicos como la neoplasia. El ciclo celular es pues, una colección de procesos muy ordenados cuyo objetivo final es la duplicación de la célula [1].

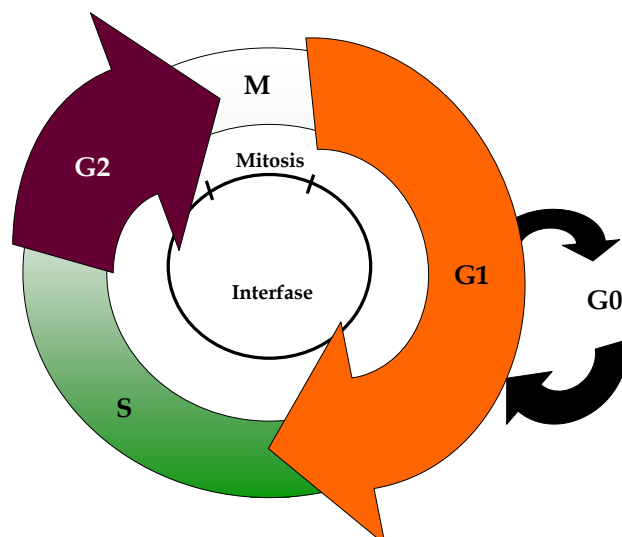


Figura I.1. Fases del ciclo celular

La progresión del ciclo celular en las células eucariotas está asociada a la expresión de grupos de genes definidos en fases específicas. Concretamente el ciclo celular está subdividido en 2 etapas (Figura I.1), la mitosis (M) donde se produce la segregación del DNA cromosómico duplicado y separación en dos células hijas [2], y la interfase, que comprende todas las fases entre dos procesos de mitosis. La interfase a su vez está estructurada en 3 fases: G1, S y G2. Durante la fase G1, la célula reconoce su entorno e induce su crecimiento. Si las condiciones son las propicias, la célula entra en fase S o de síntesis del ADN replicando el material genético. Le sigue la fase G2 donde las células continúan creciendo como en la fase G1 y se preparan para la mitosis. Esta última fase permite a la célula corroborar la correcta y completa replicación del ADN antes de iniciar definitivamente la mitosis. La mitosis se divide, a su vez, en 4 fases, llamadas profase, metafase, anafase y telofase que van acompañadas de la división citoplasmática o citoquinesis dando lugar a dos células hijas idénticas genéticamente [2].

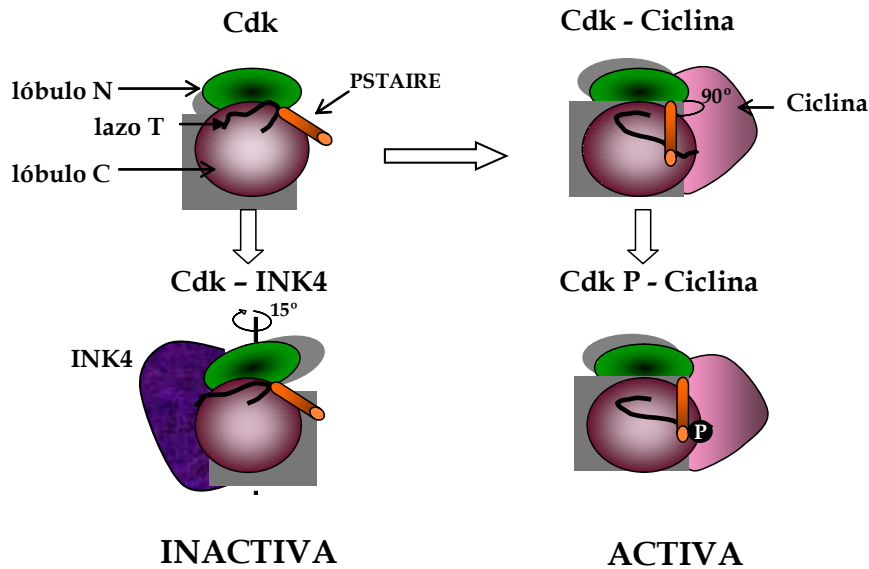
Además de estas 4 etapas del ciclo celular, existe una fase adicional llamada G0. En esta fase entran las células que salen del ciclo celular, pasando a una fase de diferenciación o bien entrando en un estado de quiescencia o reposo. En respuesta a ciertos estímulos externos, algunas células quiescentes pueden reactivarse y entrar en ciclo de nuevo [3]. Cuando las células en fase G0 entran en ciclo, generalmente requieren continua estimulación mitogénica para conducir a la célula al punto de restricción (ver apartado 1.1), una vez en el punto de restricción estos estímulos mitogénicos desaparecen, y la célula entra en fase S y completa el ciclo [2].

Dada la importancia del ciclo celular en un organismo, es necesario que este proceso se realice correctamente. Para ello, se llevan a cabo controles por distintos mecanismos, que ayudan a la correcta consecución del mismo.

En las células eucariotas, la progresión del ciclo celular está asociada a la transcripción periódica de genes reguladores activadores o represores del crecimiento [4]. Las Cdks (quinasas dependientes de ciclinas) son reguladoras clave en las transiciones del ciclo celular.

El complejo ciclina-Cdk es un holoenzima de la familia de las Ser/Thr proteína kinasas que actúa regulando distintos puntos esenciales de transición en el ciclo celular. Este complejo está formado por dos subunidades, la Cdk y la ciclina. La Cdk actúa como subunidad catalítica y la ciclina como subunidad reguladora. Por tanto, para que la Cdk sea activa es indispensable que vaya unida a una ciclina. Los niveles

de Cdk son constantes y son los niveles variables de ciclina los que regulan, entre otros, la actividad de la Cdk y la especificidad de sustrato [1]. Existen distintos tipos de Cdk y de ciclinas que actúan en distintas partes del ciclo y en distintos tipos celulares [5].



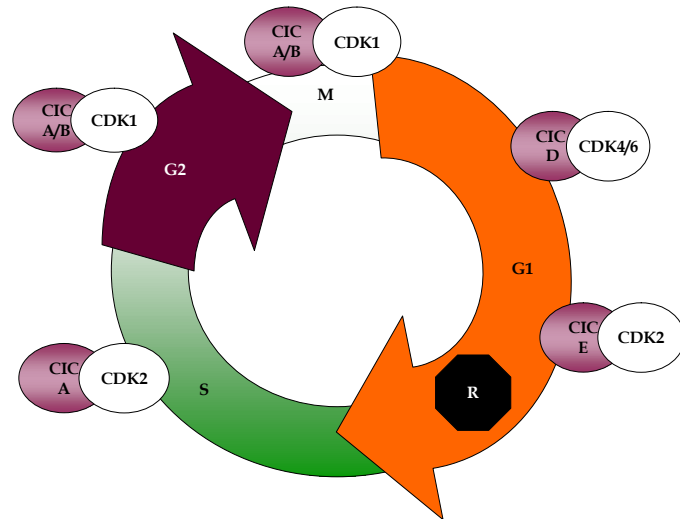
**Figura I.2.** Estructura y mecanismos de regulación de la Cdk4 por cambios en su estructura. Adaptado de Ortega et.al 2002.

La estructura de la Cdk es muy parecida a las ya descritas para otras proteínas kinasas de las células eucariotas [6]. La estructura consiste en un lóbulo N-terminal en forma de lámina  $\beta$ , en un lóbulo C-terminal en forma de  $\alpha$ -hélice y en un profundo surco en medio de los dos lóbulos que es el lugar de unión y de catálisis del sustrato (ATP). Existen dos regiones en las Cdk que las distinguen de las proteínas kinasas convencionales y que son puntos de regulación. Una de las regiones es una  $\alpha$ -hélice con una secuencia única PSTAIRE y la otra es un lazo regulador, llamado lazo T, donde se localiza el sitio de activación por fosforilación [7] (Figura I.2).

Las ciclinas, reciben su nombre del hecho que su expresión cambia a lo largo del ciclo. Su actividad es controlada básicamente por sus niveles de expresión. Los niveles de cada ciclina se regulan a nivel de transcripción y también de degradación mediante la vía de las ubiquitinas y dependen de la fase del ciclo en el que se encuentre la célula. A su vez, los niveles de ciclinas también se controlan a nivel de transcripción [8].

Las ciclinas pueden interaccionar con múltiples Cdk uniéndose a una parte del surco catalítico de la Cdk, interaccionando con los dos lóbulos de la Cdk formando una interfase proteína-proteína continua [7].

Para mantener el correcto orden temporal de las distintas fases del ciclo celular, las parejas ciclina-Cdk deben actuar solamente en unos puntos específicos [5] (Figura I.3).



**Figura I.3.** Distribución de los distintos complejos ciclina-Cdk a lo largo del ciclo celular.

Durante la fase G1, se expresan la ciclina D y la ciclina E que son las encargadas del inicio del ciclo. La Cdk4 y la Cdk6 se asocian a ciclinas del tipo D formando el complejo ciclina-Cdk. El complejo ciclina D-Cdk4 y el complejo ciclina D-Cdk6 fosforilan la proteína del retinoblastoma (pRb) [9] inhibiendo así su capacidad supresora del crecimiento y permitiendo la entrada en fase S, por la liberación del factor de transcripción heterodimérico E2F-DP1 por parte de la pRb. El factor E2F-DP1, a su vez, inducirá la expresión, entre otros, de genes reguladores del crecimiento como la ciclina E y la ciclina A (Figura I.4) [2].

En las etapas tardías de la fase G1, la Cdk2 se une a la ciclina E formando un complejo que colaborará con el complejo ciclinaD-Cdk4 para la completa fosforilación de la pRb. El complejo ciclina E-Cdk2 es esencial para el inicio de la replicación del ADN en la fase S. El complejo ciclina E-Cdk2 fosforila también otros sustratos y su acción está íntimamente ligado a la activación del origen de replicación. Una vez iniciada la fase S la ciclina E se degrada y es sustituida por la ciclina A. El complejo Ciclina A-Cdk2 desempeña una función importante durante la síntesis del material genético [2]. Tanto la ciclina A y como la ciclina B son ciclinas mitóticas. La ciclina A se sintetiza durante la fase S y se degrada durante la anafase, mientras que la ciclina B1 se sintetiza durante una etapa tardía de la síntesis y tiene su máxima expresión durante la transición de la fase G2 a la fase M y se degrada durante la anafase. La Cdk1 forma complejo con la ciclina B1, este complejo es activado por la fosfatasa CDC25 al final de la fase S y conduce a la célula a la entrada en mitosis. Tanto la ciclina A como la ciclina B forman complejos con la Cdk1 durante la mitosis [2].

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, una única Cdk de 34 kDa (cdk1/cdc2/p34<sup>CDC28</sup>), es el controlador general del ciclo celular, uniéndose secuencialmente

formando complejos holoenzimáticos activos con ciclinas de la fase G1, de la fase S o de la mitosis, para dirigir las distintas transiciones entre fases del ciclo celular [10, 11].

### **1.1 Transición fase G1-S: Implicación del complejo ciclina D-Cdk4. El punto de restricción**

La fase G1 es la fase inicial del ciclo celular, donde las células deben adquirir toda la información necesaria para proceder con total seguridad a la siguiente fase, la fase S. En la fase G1 del ciclo, las células evalúan los estímulos extracelulares que reciben para decidir el destino de la célula, bien hacia un proceso de proliferación mediante su entrada en ciclo o bien, hacia un estado de quiescencia, G0.

Al igual que las levaduras, una vez las células toman la decisión de entrar en ciclo y alcanzan la fase tardía de G1, se llega a un punto de no retorno, y deben completar como mínimo un ciclo, ya que se vuelven mitógeno-independientes. En este punto, donde las células pasan de ser mitógeno dependientes a mitógeno independientes se llama punto de restricción [12]. Punto de restricción (R) o *checkpoint* es el nombre que se le da a una vía bioquímica que asegura la dependencia de un proceso respecto a otro que no está relacionado bioquímicamente. En el ciclo celular es muy usado este término para indicar el control de la transición entre las distintas fases del ciclo. El término *checkpoint* fue acuñado por primera vez por Arthur Pardee en 1974 [13].

Principalmente, son las familias de ciclinas D con sus 3 tipos D1, D2 y D3 y la ciclina E formando complejo con la Cdk4, la Cdk6 y la Cdk2, las que intervienen en este punto del ciclo llamado punto de restricción.

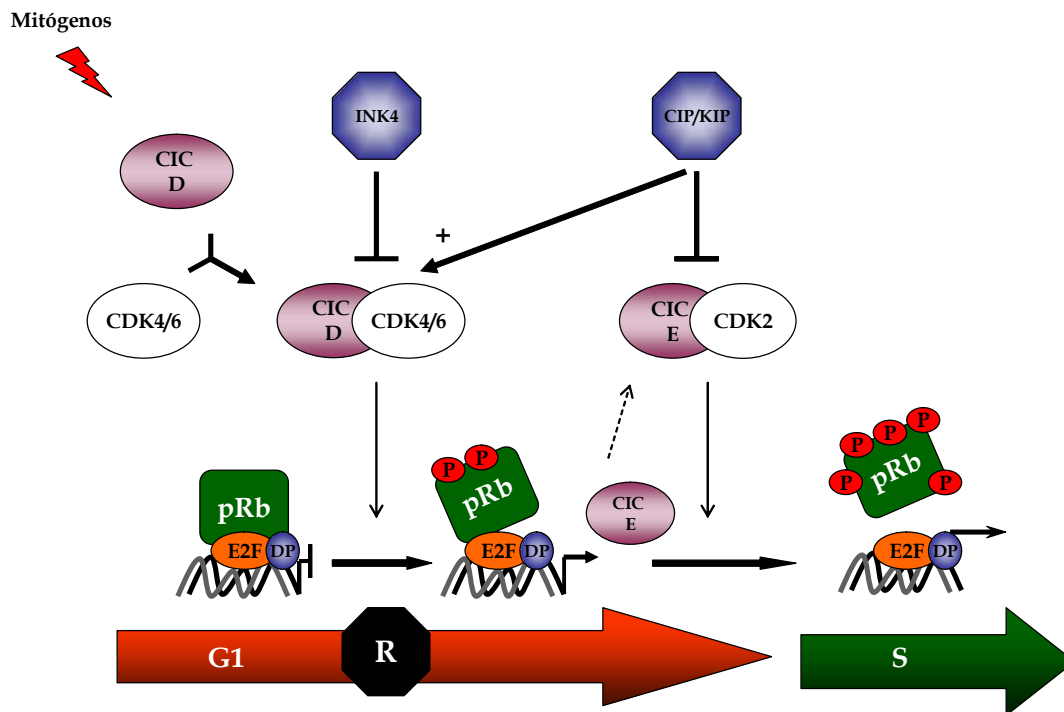
La Cdk4 y la Cdk6 son unas kinasas reguladoras clave en la transición G1-S del ciclo celular y efectoras del punto de restricción. Estas dos kinasas coexisten en muchos tejidos, sin embargo la abundancia relativa de estas dos proteínas difiere en los distintos tipos celulares [12].

Las ciclinas D son expresadas en respuesta a factores de crecimiento, a mitógenos o a inductores de diferenciación y rápidamente se degradan cuando los mitógenos se retiran. Las ciclinas D son inducidas mientras persiste la estimulación de los factores de crecimiento, con unos niveles bastante constantes durante toda la fase G1, llegando a un pico máximo durante la transición de la fase G1 a la fase S. No obstante, se degradan rápidamente cuando los factores mitogénicos desaparecen, independientemente de la situación del ciclo en la que se encuentre la célula. Si se encuentra en fase G1, la célula no entra en fase S, pero si la retirada de los factores se



produce en un estado más avanzado del ciclo celular, no tiene efecto sobre la consecución del ciclo celular. La asociación de la ciclina D a la Cdk4 no tiene lugar hasta la mitad de la fase G1 y aumenta a medida que la célula se acerca a la transición G1/S [9].

El complejo ciclinaD-Cdk4 y el complejo ciclinaD-Cdk6, conducen a la célula durante la fase G1 y la ayudan a superar el punto R. Su principal función es inactivar la pRb mediante fosforilación para permitir la activación del factor de transcripción E2F, requerido entre otras cosas para la expresión de la ciclina E [12]. La ciclina E forma complejo con la Cdk2 y ayuda al complejo ciclinaD-Cdk4/6 en la fosforilación de la pRb en una etapa tardía de la fase G1 (Figura I.4).



**Figura I.4.** Mecanismo de acción del complejo ciclina D-Cdk4 en la regulación de la transición G1/S. Adaptado de [12].

El complejo ciclinaD-Cdk4/Cdk6 tiene además otra función no catalítica que consiste en secuestrar los CKIs (Inhibidores del complejo ciclina-Cdk) facilitando la activación de la ciclina E-Cdk2 en la parte final de la fase G1. A su vez, el complejo ciclina E-Cdk2 facilita su propia activación fosforilando en un residuo de treonina específico la molécula p27<sup>Kip1</sup> (inhibidor del complejo ciclina-Cdk) que conduce a su degradación [14, 15]. Estos cambios ayudan a reducir la dependencia de la célula de los

mitógenos y por tanto resulta en el compromiso irreversible de la célula de entrar en fase S [16].

Los factores de crecimiento necesarios para la consecución del ciclo son también necesarios para la supervivencia de la célula. Si eliminamos los mitógenos de células de mamíferos, éstas pueden salir del ciclo con el ADN no duplicado y entrar en un estado de quiescencia (G0) donde la síntesis macromolecular está reducida. Otros tipos celulares se paran transitoriamente y luego se apoptotizan [17].

Fibroblastos que sobreexpresan ectópicamente tanto la ciclina D como la Cdk4 permanecen en un estado de quiescencia si las células están deprivadas de factores de crecimiento. La estimulación con suero reestablece los niveles fisiológicos de actividad del complejo ciclinaD-Cdk4. Por tanto, los factores mitogénicos no sólo regulan los niveles de ciclina D, sino que además regulan la formación del complejo y por tanto su actividad [9].

Las evidencias experimentales de la última década parecen indicar que el último responsable del paso del punto R es la familia de pRb [18]. La proteína del retinoblastoma es una proteína supresora de tumores, importante en la regulación del ciclo celular. Su función es la prevención de la transcripción de genes reguladores del crecimiento. Al inicio de la fase G1, cuando la pRb se encuentra en su estado hipofosforilado y por tanto, activo, es capaz de unir más de 80 proteínas, entre ellas el factor E2F [19]. El modo como la pRb inactiva el factor E2F es por interacción funcional que conduce a la inactivación del factor tanto por secuestro de sus dianas fisiológicas, como por la formación de complejos inactivos. La interacción pRB-E2F es sensible a la fosforilación de la pRb [4]. Sin embargo, otros eventos post-traduccionales como la acetilación pueden influir también en la actividad de pRb [20].

E2F es un factor que induce genes importantes en la replicación del ADN, la ciclina A y la ciclina E. El factor E2F es un heterodímero formado por un miembro de la familia E2F y por un miembro de la familia DP [4].

## **1.2 Regulación de la Cdk4**

Como reguladoras clave del ciclo celular, las Cdks deben estar finamente controladas por señales extra e intracelulares. Se conocen múltiples mecanismos para regular la actividad de los complejos ciclina-Cdk. Concretamente la actividad de la Cdk4 está controlada por 4 mecanismos bioquímicos muy conservados (Figura I.5).

Síntesis y degradación de ciclinas, fosforilación y desfosforilación de las Cdk, asociación de los complejos ciclina-Cdk a ciertos inhibidores y la localización subcelular de los complejos ciclina-Cdk [5, 7, 8].

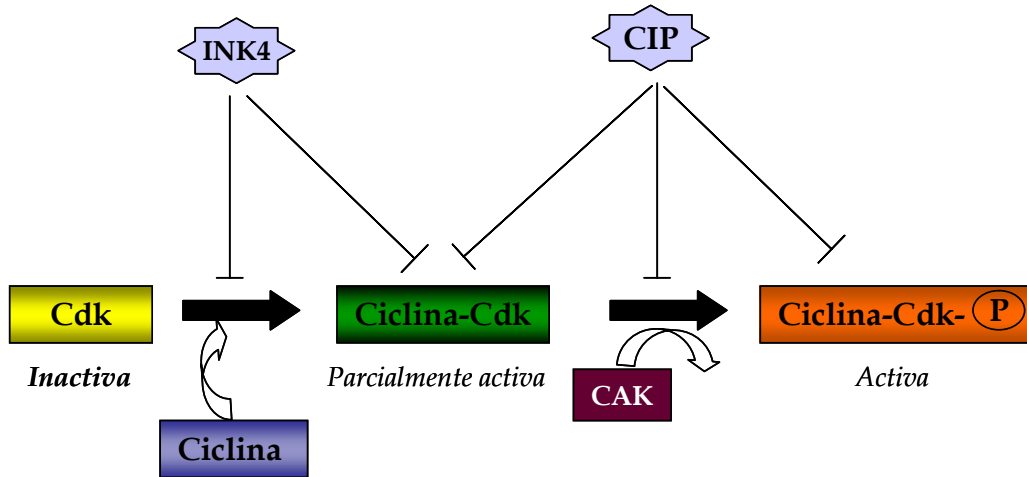


Figura I.5. Mecanismos de regulación de la Cdk para su activación.

La subunidad Cdk una vez sintetizada no tiene actividad detectable. Su activación ocurre mediante dos procesos: la unión a su subunidad reguladora, la ciclina D y posterior entrada del complejo al núcleo; y en segundo lugar por la fosforilación del complejo ciclinaD-Cdk por CAK (Cyclin activating kinase). Este proceso de activación puede ser truncado por 2 familias de proteínas inhibidoras del ciclo celular (INK4 y CIP/KIP), que se unen al complejo ciclinaD-Cdk4 y lo inactivan. Además, la fosforilación de otro residuo de la Cdk4 tendrá una función inhibitoria importante.

### 1.2.1 Regulación del complejo mediante los niveles de ciclina D y su localización subcelular

El primer regulador de la actividad de la Cdk es la subunidad ciclina. La homología entre ciclinas está generalmente limitada a un dominio de 100 aminoácidos, denominado la caja de ciclina, y que es responsable de la unión a Cdk y de su activación. La ciclina activa la Cdk mediante cambios conformacionales (Figura I.2). La ciclina mueve la hélice de PSTAIRE en el surco catalítico girándola unos 90° y cambia también la estructura y la posición del Lazo T. La importancia de la secuencia PSTAIRE es que contiene en su sitio catalítico un ácido glutámico en posición 51 (Glu51), conservado entre las proteína-kinasas eucariotas. Sin la ciclina el sitio de la cadena que contiene el ácido glutámico está fuera del surco catalítico. Cuando la ciclina se une a la

Cdk, el cambio en la hélice PSTAIRE lleva al Glu51 dentro del surco catalítico. Allí y juntamente con un residuo de lisina, un residuo de aspártico y un ión magnesio coordinan los átomos de fosfato del ATP y los orientan correctamente para que tenga lugar la reacción catalítica [7].

La importancia funcional del lazo T es doble, por una parte sin la ciclina, el Lazo T se sitúa en frente de la entrada del surco catalítico, por otra parte, el cambio de posición del lazo T deja expuesto el lugar de fosforilación [7].

En referencia a la localización subcelular, la ciclina D1 no tiene una localización nuclear estática. Los niveles de ciclina D1 nuclear aumentan durante la fase G1, pero al iniciarse la fase S el complejo ciclinaD-Cdk4 es exportado al citoplasma [5]. Se ha descrito también que la ciclina D1 puede ser fosforilada por la glicógeno-sintasa kinasa  $3\beta$  produciendo su relocalización del núcleo al citoplasma, donde se convierte en una diana para la proteólisis [21]. Ni la ciclina D, ni la Cdk4, contienen secuencias de entrada al núcleo conocidas, es por ello que se hipotetiza, que el complejo Cdk4-ciclina D utilizaría la clásica secuencia de localización nuclear (NLS) de la proteína p21 (miembro de la familia de inhibidores CIP/KIP, ver apartado 1.2.3) para entrar. A parte de la p21, el complejo estaría formado también por otra proteínas PCNA (proliferating cell nuclear antigen) que es una subunidad de la ADN polimerasa  $\delta$  que actúa tanto en la replicación como en la reparación del ADN [18].

Se ha demostrado que fibroblastos de embrión de ratón (MEFs) deficientes en p21 y p27, tienen mermada la capacidad de ensamblaje de ciclinaD y Cdk4, y que cuando se reintroducen estos inhibidores las células reestablecen los niveles normales de complejo Ciclina D - Cdk4 [22].

## **1.2.2 Regulación del complejo ciclina D-Cdk4 por fosforilación/ defosforilación**

Además de la unión a ciclina, la Cdk4 requiere la fosforilación de un residuo de treonina en la posición 172 (Thr 172) para su activación (Figura I.2) [9, 23]. La treonina se encuentra en el lazo T bloqueando la unión de las proteínas sustrato a la Cdk4. El lazo T debe moverse para que el residuo Thr 172 pueda ser fosforilado [24, 25]. La unión de la Cdk4 a la ciclina desplazaría el lazo T facilitando la fosforilación de la Cdk4. Una vez la Cdk4 ha sido fosforilada en la posición 172, surge otro cambio conformacional y el grupo fosfato que actúa de organizador central en esta región, desplazaría de nuevo el lazo T mediante su unión a tres argininas, cada una proveniente de una parte distinta de la estructura (lóbulo C, lóbulo N, Lazo T), dejando

accesible el sitio de unión al sustrato (Figura I.2) [8]. Por tanto, la fosforilación completa la reorganización del lugar de unión del sustrato iniciada por la ciclina.

El enzima responsable de la fosforilación de la Cdk4 es CAK. CAK es un unidad enzimática cuya subunidad catalítica es una proteína-kinasa relacionada con la Cdk (Cdk related protein kinase), llamada MO15 o Cdk7, la otra principal subunidad es la ciclina H [26]. Una sola CAK puede fosforilar la mayoría de Cdks. La localización celular de CAK es nuclear [8].

La fosforilación también puede inactivar la Cdk4. Concretamente, la fosforilación en el residuo tirosina en posición 17 (Tyr 17) inactiva la Cdk4. La posición que ocupa este residuo es un sitio de unión de ATP, por lo que está en una posición ciertamente comprometedor para la actividad de la kinasa en caso de fosforilación [8]. El enzima encargado de esta fosforilación inactivante se denomina Wee1.

La fosfatasa encargada de desfosforilarlo este residuo es la CDC25A, volviendo a la Cdk4 a su conformación activa [27].

### 1.2.3 Regulación del complejo ciclina-Cdk4 mediante inhibidores

Se han descrito principalmente dos familias de inhibidores (CKI) implicadas en el proceso de inhibición del complejo ciclina-Cdk, basándose en su estructura y sus dianas. La familia CIP/KIP y la familia INK4 [16].

La familia CIP/KIP la forman p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup>, que actúan uniéndose al complejo ciclina-Cdk. Se les considera inhibidores moderados de la actividad ciclinaD-Cdk4. El mecanismo de acción se ha descrito en caso de la p27, donde el mimetismo de la estructura del ATP tanto en su posición como en los contactos con la zona catalítica, explican su acción inhibitoria [7]. Los inhibidores CIP/KIP tienen un espectro general de acción en todos los complejos que intervienen en el ciclo celular. Como ya se ha comentado anteriormente (ver apartado 1.2.1) pueden actuar también como reguladores positivos de las kinasas dependientes de ciclina D.

El papel de p21 en el ciclo celular no está claro y parece ser que depende de su concentración. Mientras que a bajas concentraciones, nuevas evidencias sugieren que su principal función sería facilitar la progresión del ciclo celular asegurando la apropiada activación de la Cdk4, ya que actúa como factor de ensamblaje, ayudando a la unión de la ciclina D a dicha kinasa, y la supervivencia de la célula (ver apartado 1.2.1). A altas concentraciones actuaría como inhibidor del ciclo celular impidiendo la actividad de la CAK. Parece ser, que el aumento del número de moléculas del complejo

Cdk4-Ciclina D, estabilizaría y prevendría la degradación de p21 [18, 28]. La síntesis de p21 está directamente regulada por p53 que es una proteína de supresión tumoral. Por tanto p21 es el punto neurálgico de la regulación del ciclo celular por parte de p53 [18].

La familia de inhibidores Ink4 (*Inhibitors of Cdk4*) está formada por p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>. Estos inhibidores actúan usando una estrategia indirecta, uniéndose a la Cdk aislada impidiendo así, su unión a la ciclina y, por tanto, su activación. De todos modos se sabe que estos inhibidores también pueden unirse al complejo una vez ya formado. Esta familia de inhibidores es exclusiva de las Cdks de la fase G1 (Cdk4 y Cdk6) y cuentan en su estructura con múltiples repeticiones de dominios de anquirina [7].

El mecanismo de acción de esta familia se ha descrito en el caso de la unión de p16<sup>INK4a</sup> a Cdk6. El inhibidor se une cerca del surco catalítico, opuesto a donde se uniría la ciclina e interacciona con los lóbulos N y C para formar una interfase continua, causando cambios alostéricos en la Cdk (ligera rotación de los lóbulos bajo un eje vertical) que se propagan y alteran el sitio de unión a ciclina (Figura I.2). Este giro causa la desalineación de los lóbulos C, N y la hélice PSTAIRE respecto a la unión de la ciclina del modo normal. Los sitios de unión del inhibidor y de la ciclina no se solapan y ello explica porque el inhibidor INK4 también puede unirse al complejo una vez formado sin disociar la ciclina. No obstante, la unión activa de la ciclina y del inhibidor es incompatible, porque ambos necesitan la interacción con los 2 lóbulos y el lazo T, y la orientación requerida es distinta.

Éste no es el único mecanismo de regulación por parte de la familia INK4, el surco catalítico donde se encuentra el lugar de unión a ATP y cerca del sitio de unión a p16 está desplazado. Esta distorsión no impide la unión del ATP pero sí que reduce su afinidad [7].

Por tanto, la intrínseca flexibilidad estructural de la Cdk desempeña una función central en el amplio espectro de posibilidades de regulación que tiene.

### **1.3 Modelos animales relacionados con la vía Cdk4-CiclinaD-INK4-pRb-E2F**

El papel central de la CDK4 en G1 se ha cuestionado estos últimos años por la aparición de distintas evidencias genéticas.

Por una parte, la ablación del locus de la Cdk4 en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, un organismo que sólo tiene una Cdk asociada a ciclina, *DmCdk4*, resulta

en un fenotipo viable [29]. Por otra parte, usando la clásica tecnología de transgénicos, se han desarrollado una serie de modelos murinos para el estudio in vivo de la funcionalidad de componentes individuales de la vía ciclina D/Cdk4/Cdk6/INK4/pRb/E2F. Estos modelos también cuestionan la relevancia de la Cdk4 en el ciclo celular en general. En la tabla I.1 se muestran los modelos murinos más relevantes que han aparecido en relación a la vía Cdk4-ciclinaD-INK4-pRb-E2F.

Diana	modificación genética	Fenotipo	Ref.
<b>pRb</b>	Anulación de la expresión	Defectos en neurogénesis y hematopoyesis	[30-32]
<b>P15<sup>INK4b</sup></b>	Genoanulado	Hematopoyesis extramedular esplénica y elevada proliferación linfocitaria in vitro en respuesta a estímulos mitogénicos	[33]
<b>P16<sup>INK4a</sup></b>	Exón 1 $\alpha$ delecionado	Hiper celularidad timocítica y aumento de la proliferación de sus esplenocitos in vitro	[34]
<b>P18<sup>INK4c</sup></b>	Genoanulado	Aumento del tamaño corporal, desórdenes linfoproliferativos, quistes en riñón y glándula mamaria.	[33]
<b>P15<sup>INK4b</sup> y p18<sup>INK4c</sup></b>	Doble genoanulado	Fenotipo similar al de los genoanulados simples de cada uno de los inhibidores.	[33]
<b>P18<sup>INK4c</sup> - p19<sup>INK4d</sup></b>	Doble genoanulado	Infertilidad masculina. Fenotipo similar al del P18 <sup>INK4c</sup> genoanulado simple	[33]
<b>ciclina D1</b>	Genoanulado	Tamaño corporal menor y dramática reducción del número de células en la retina	[27]
<b>ciclina D1</b>	Sobreexpresión	Hiperplasia mamaria	[35]
<b>ciclina D2</b>	Genoanulado	Diabetes, deficiencias en el cerebelo, proliferación defectuosa de los linfocitos B y esterilidad en las hembras	[36, 37] [38]
<b>ciclina D3</b>	Genoanulado	Desarrollo hematológico anómalo	[37]
<b>ciclina D1 y ciclina D2</b>	Doble genoanulado	No viable. El modelo Ciclina D2 -/-, D1 +/- presenta una diabetes severa	[38]
<b>Cdk2</b>	Genoanulado	Desarrollo embrionario o postnatal normal, a excepción de las células germinales	[39]
<b>Cdk6</b>	Genoanulado	Timo y bazo reducido, reducción del número de megacariocitos y glóbulos rojos. Hembras más	[39]

		pequeñas y cerca del 30% son estériles	
<b>Cdk2-Cdk6</b>	Doble genoanulado	Esterilidad, defectos de espermatogénesis, oogénesis, defectos en células hematopoyéticas y peso reducido	[39-41]
<b>Cdk4</b>	Genoanulado	Tamaño corporal reducido, esterilidad y diabetes insulino-dependiente.	[42]
<b>Cdk4 -Cdk6</b>	Doble genoanulado	Letal debido a una anemia severa. Sin embargo, los embriones tienen una organogénesis normal	[41]
<b>Cdk4R24C</b>	Genomodificado	Tamaño corporal superior e hiperplasia de las células $\beta$ pancreáticas	[42]

**Tabla I.1.** Modelos murinos desarrollados para el estudio de la vía ciclinaD/ Cdk4/ Cdk6/ INK4/ pRb/ E2F, fenotipo que muestran y tipo de modificación genética efectuada. Ref. = Referencia bibliográfica.

La generación de ratones genoanulados (*knockout*) para pRb puso de manifiesto una función esencial de este gen durante el desarrollo embrionario para la correcta diferenciación y el control de la proliferación en tipos celulares concretos como eritrocitos, hepatocitos y células del sistema nervioso central [30-32].

### 1.3.1 Modelos con alteración de alguno los miembros de la familia INK4

La relevancia de cada uno de los miembros de la familia de inhibidores de la Cdk4, INK4 (p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>), ha sido dilucidada mediante aproximaciones genéticas, usando animales genéticamente modificados para alguno de estos inhibidores. También se ha estudiado el posible efecto sinérgico de estos inhibidores mediante la generación de dobles transgénicos.

Se han generado dos cepas distintas de ratones genoanulados para p16<sup>INK4a</sup>. El primero mediante la expresión de la proteína truncada. Estos animales se desarrollan normalmente y no desarrollan tumores, a excepción de un pequeño número, que desarrolla linfomas de célula B de larga latencia [43]. En segundo lugar, animales homocigotos para la proteína p16<sup>INK4a</sup> con el exón 1 $\alpha$  delecionado, presentan una gran variedad de tumores [34], la causa de la diferencia de fenotipo entre estos dos modelos, teniendo en cuenta que se generaron en el mismo fondo genético, no se ha dilucidado aún. Estos animales presentan además hiperplasia timocítica y aumento de la proliferación de sus esplenocitos in vitro.



En referencia a la proteína p15<sup>INK4b</sup>, se ha desarrollado un ratón genoanulado, este ratón desarrolla tumores, principalmente hemangiosarcomas, con una baja incidencia (10%). Presentan también hematopoyesis extramedular esplénica y elevada proliferación linfocitaria in vitro en respuesta a estímulos mitogénicos [33].

La proteína p18<sup>INK4c</sup> también dispone de un modelo genoanulado [33]. Los animales genoanulados para la proteína p18<sup>INK4c</sup> tienen un tamaño superior, desarrollan a corta edad hiperplasia de la pituitaria, que progresa lentamente a adenomas de pituitaria. Desarrollan tumores en una amplia variedad de tejidos, cosa que indica que la proteína p18<sup>INK4c</sup> ejerce su función en gran variedad de tejidos [33].

Para estudiar el papel sinérgico que puedan tener estos inhibidores, se desarrollaron distintos modelos genoanulados múltiples de estos supresores tumorales. El doble genoanulado p15<sup>INK4b</sup> y p18<sup>INK4c</sup> no tiene un fenotipo más severo que el genoanulado simple de cada uno de los inhibidores, lo que sugiere que ejercen su actividad en distintos tipos celulares [33]. El doble genoanulado p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup> tiene la misma incidencia tumoral que el p18<sup>INK4c</sup> genoanulado simple.

Se han realizado cruces de ratones deficientes en inhibidores de la familia INK4, con ratones deficientes en proteínas de la familia CIP/KIP. Estos cruces han revelado un nivel de cooperación significativo entre estas dos familias de proteínas [12].

### 1.3.2 Modelos con alteración en la ciclina D

Aunque existen evidencias experimentales in vitro que hacen suponer que la ciclina D tiene una función conductora de la fase G1 del ciclo celular, parece que su papel in vivo no es tan relevante.

La sobreexpresión de las ciclinas D in vitro, acelera la transición G1/S del ciclo celular [44]. En cambio in vivo, los ratones modificados genéticamente muestran defectos tejido-específicos que ilustran la función tisular específica que estas subunidades reguladoras desempeñan in vivo. Por ejemplo, los ratones genoanulados para la ciclina D1 presentan un tamaño corporal menor y la mayoría de ellos mueren durante el primer mes de vida [27]. Además, se observa una dramática reducción del número de células en la retina, lo cual sugiere que esta ciclina está implicada activamente en las células precursoras de retina. El epitelio mamario también se ve afectado por esta ciclina, observándose un paro en la proliferación en respuesta a hormonas esteroideas ováricas [45, 46]. Finalmente animales que sobreexpresan la

ciclina D1, bajo el promotor MMTV desarrollan hiperplasia mamaria y mueren a edades tempranas por cáncer de mama [35].

Por otra parte, la ausencia de ciclina D2 impide la proliferación de las células de Sertoli testiculares y las células de la granulosa ováricas en respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH). Por tanto, las hembras genoanuladas para la ciclina D2 son estériles. En lo que respecta a los machos, a pesar de exhibir testículos hipoplásicos, permanecen fértiles. Estos animales presentan también deficiencias en el cerebelo y una proliferación defectuosa de los linfocitos B [36, 37]. Es interesante destacar la importante función que desarrolla la ciclina D2 en la proliferación de la célula beta de los islotes pancreáticos y en la homeostasis de la glucosa en la etapa adulta de la vida del ratón. El ratón genoanulado para la ciclina D2 desarrolla diabetes [38]. Este modelo se tratará más adelante en el apartado 3.1.1.

En cuanto a la ciclina D3, es posiblemente de la que se tiene menor información. El ratón genoanulado para la ciclina D3 presenta un desarrollo hematológico anómalo. Recientemente, se ha descubierto que podría tener un papel esencial en la adipogénesis, pero que esta función la desarrollaría de forma Cdk-independiente [47]. También se destaca su papel de forma individual en la inducción de apoptosis [48].

Se ha descrito también el modelo murino doble genoanulado para la ciclina D1 y D2, el cual no es viable. Sin embargo, el animal genoanulado para la ciclina D2 y heterocigoto para el alelo mutante ciclina D1 (ciclina D2  $-/-$ , D1  $+/-$ ) presenta una diabetes severa debido a una secreción de insulina defectuosa [38].

### 1.3.3 Modelos con alteración de las Cdks.

En los últimos años se han generado múltiples modelos con alteración en alguna de las Cdks, para desvelar su función *in vivo*. De todos estos modelos, se puede extraer que, si bien la cascada del ciclo celular está muy bien definida, son muchas las funciones redundantes que estas kinasas realizan, quizá como mecanismo de defensa en caso de fallo o ausencia de alguna de ellas, aunque en condiciones normales no realicen esa función.

De la proteína Cdk2 se ha descrito que es esencial para la meiosis pero no para la mitosis, ya que el ratón genoanulado para esta ciclina no tiene consecuencias importantes en el desarrollo embrionario o postnatal, a excepción de las mostradas en las células germinales. Concretamente, en la meiosis la Cdk2 estaría implicada en la profase 1 [39]. Posiblemente la compensación por otra kinasa, la Cdk1 en el caso de la

unión a la ciclina A y la Cdk4 o la Cdk6 en la fosforilación de la pRb, sea la causa de la ausencia de relevancia de la Cdk2 en la mitosis [39].

El ratón deficiente en Cdk6 es viable, si bien la hematopoyesis está un poco alterada, timo y bazo están reducidos y se observa una reducción drástica del número de megacariocitos y glóbulos rojos. Las hembras son más pequeñas y cerca del 30% son estériles [41].

Se han generado distintos modelos murinos mediante ingeniería genética (*gene targeting*), para caracterizar la función de la Cdk4 en el ciclo celular in vivo. Principalmente se puede destacar su relevancia en la proliferación de la célula  $\beta$  pancreática, objeto de estudio de la presente tesis, y cuyos efectos concretos se explicarán en el apartado 3.1.1.

A nivel general la Cdk4 interviene de forma crucial en el crecimiento y fertilidad. Los animales genoanulados para la Cdk4 tienen un tamaño inferior y presentan infertilidad causada por una deficiencia en las células de Leydig testiculares en machos, y la ausencia de cuerpo lúteo en hembras, indirectamente causados por una celularidad limitada en la adenohipófisis. Cabe destacar que además presentan una diabetes severa insulino dependiente por un defecto importante en la proliferación de la célula  $\beta$  a nivel post-natal. Esto nos sugiere que la Cdk4 en general, no es esencial para la transición entre G1/S, sin embargo a nivel tejido-específico, es imprescindible para el correcto desarrollo de la célula  $\beta$  en edad adulta de la vida del ratón [42] y para la proliferación postnatal de la pituitaria anterior [49].

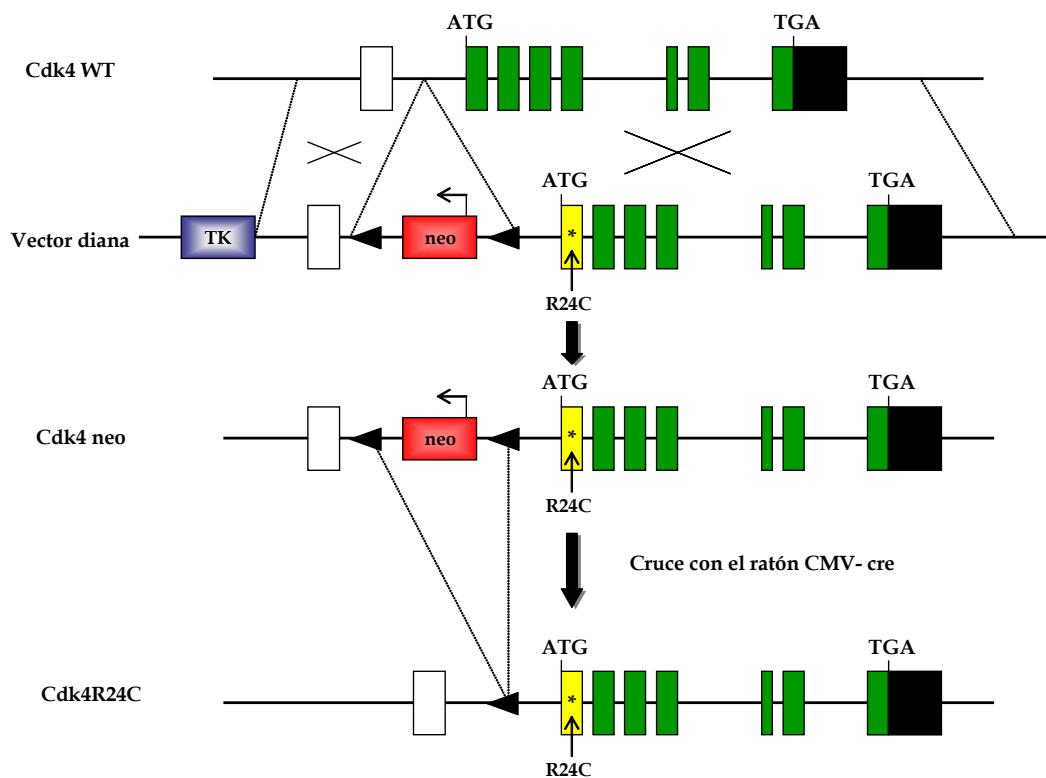
Otros posibles efectos se ven enmascarados por el efecto redundante que ejerce en algunos tejidos la Cdk6.

Para desenmascarar este efecto Malumbres et al. [41] generaron un doble genoanulado para Cdk4 y Cdk6. Este modelo si bien es letal debido a una anemia severa, los embriones muestran una organogénesis normal y los distintos tipos celulares proliferan normalmente. Fibroblastos embriónicos deficientes en Cdk4 y Cdk6, proliferan y se vuelven inmortales después de diversos pasajes. Además, células quiescentes también deficientes en estas 2 kinasas responden a estímulos por suero y entran en fase S con una cinética normal, aunque de baja eficiencia [41]. Por tanto, las kinasas dependientes de ciclinas D no son esenciales para la entrada en ciclo en los modelos celulares estudiados y ello sugiere la existencia de un mecanismo alternativo para iniciar la proliferación sin estímulos mitogénicos [41].

Los dobles genoanulados Cdk6-Cdk2 presentan un fenotipo parecido al ya descrito en ausencia de sólo una de las kinasas: esterilidad, defectos de espermatogénesis y oogénesis, defectos en células hematopoyéticas y peso corporal reducido [41].

### 1.3.3.1 El modelo genomodificado (knockin) Cdk4R24C

Junto con el modelo genoanulado para la Cdk4, el modelo genomodificado Cdk4R24C fue generado en el laboratorio del Dr. Mariano Barbacid [42] cruzando los ratones Cdk4<sup>+/neo</sup> con ratones CMV-Cre, que expresan de forma ubicua la recombinasa Cre bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV). Esta recombinasa reconoce los sitios LoxP y promueve su recombinación eliminando la secuencia de DNA que se encuentra entre ellos. La descendencia de este cruce deletiona el cassette de resistencia a neomicina flanqueado por los sitios LoxP por acción de la recombinasa induciendo la expresión del gen de la Cdk4, ahora con la mutación R24C, de forma normal (Figura I.6).



**Figura I.6.** Generación del modelo genomodificado Cdk4R24C. Adaptado de [42].

La mutación R24C se descubrió por primera vez en pacientes con melanoma familiar e impide la unión de la Cdk4 a los inhibidores de la familia Ink4 [50, 51].

El modelo Cdk4R24C se caracteriza por una hiperactivación de la Cdk4 debido a que la mutación R24C confiere a la Cdk4 la imposibilidad de unión a la familia de

inhibidores INK4. Esta hiperactividad de la kinasa se ve traducida en un aumento también de la fosforilación de la pRb en Cdk4R24C MEFS [52].

Los ratones homocigotos para la mutación nacen en la proporción mendeliana esperada, sugiriendo que la Cdk4 no interviene en el desarrollo embrionario, cosa que se explicaría ya que la Cdk4 no empieza a expresarse hasta el desarrollo embrionario tardío (E17,5), cuando la célula empieza a proliferar. Dichos ratones no muestran anomalías en el desarrollo y son completamente fértiles. A pesar de ello, los machos presentan un aumento en el número de células de Leydig, y en edad adulta alcanzan un peso corporal ligeramente superior al normal (5-10% más que el WT) [42]. Estos ratones desarrollan hiperplasia de ciertos tipos endocrinos entre ellos la célula  $\beta$  de los islotes pancreáticos y las células de Leydig de los testículo [42].

Cabe destacar que estos ratones desarrollan también múltiples tumores con una penetrancia del 100% y con una latencia de 10 meses a un año, siendo los más comunes los hemangiosarcomas y diversos tipos de tumores epiteliales endocrinos. Un 31% desarrollan tumores endocrinos pancreáticos [53]. Además, la mutación R24C coopera con la ausencia de supresores de tumores como p53 o p27<sup>Kip1</sup> [53]. Los ratones portadores de la mutación Cdk4R24C son muy susceptibles a los insultos carcinogénicos. Aunque estos animales no presentan evidencias de padecer melanomas, como se había observado en humanos portadores de la misma mutación [50, 51], el tratamiento tópico con DMBA (9,10-di-metil-1,2-benzoantraceno) / TPA (12-O-tetradecanoilfolbol-13-acetato) causa el desarrollo de melanomas invasivos en los ratones Cdk4R24C rápidamente [54].

Precisamente este modelo (Cdk4R24C) es el que se ha escogido en la presente tesis para el estudio del efecto de la Cdk4 en la proliferación de la célula  $\beta$ , en fondos genéticos predispuestos o no a la autoinmunidad  $\beta$  pancreática.

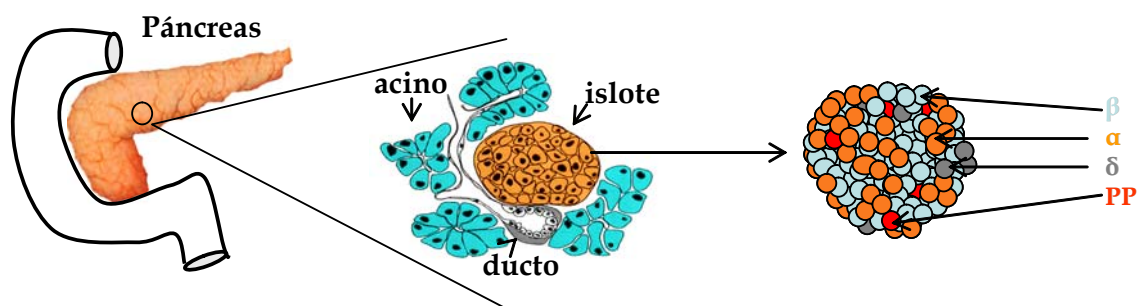
## 2 Fisiología de la célula $\beta$

La homeostasis de la glucosa está finamente controlada por las células endocrinas del páncreas, localizadas en los islotes de Langerhans. Las células endocrinas de los islotes monitorizan la concentración de glucosa en sangre y secretan hormonas dependiendo de la información bioquímica que reciban.

Las células  $\beta$  se localizan formando agrupaciones celulares llamadas islotes, junto con otros tipos celulares, en el tejido pancreático. El páncreas es un órgano que se encuentra adyacente a la curvatura larga del estómago (Figura I.7). Su nombre deriva del griego *Pan creas* que significa "tejido a través", debido a que, sobretudo en roedores, parece que penetre en la membrana del intestino [55]. Tiene dos funciones independientes:

- (a) Una función exocrina. El componente exocrino produce enzimas digestivos que, a través del conducto pancreático, llegan al duodeno.
- (b) Una función endocrina. El componente endocrino se encuentra más difuso y secreta hormonas a la circulación.

Anatómicamente el páncreas está dividido en tres regiones: La cabeza, el cuerpo y la cola. A pesar de presentar estas tres regiones, el páncreas es una estructura homogénea con un drenaje continuo de todos los lóbulos del tejido exocrino mediante ramificaciones del conducto pancreático que van a vaciarse al duodeno [55].

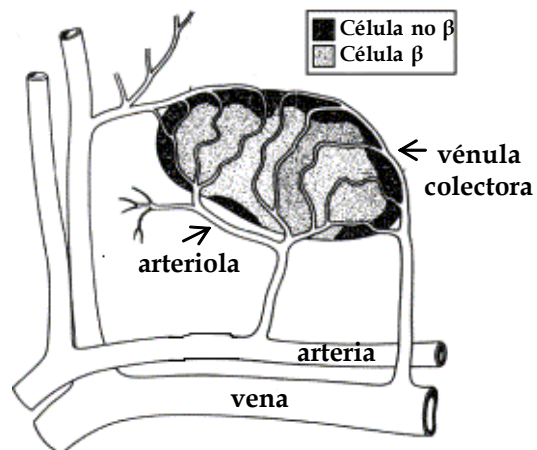


**Figura I.7.** El entorno de la célula  $\beta$ . Las células  $\beta$  se organizan, junto con las células  $\alpha$ ,  $\delta$  y las células del polipéptido pancreático, formando los islotes de Langerhans, que a su vez, junto con los acinos y ductos, formarán el tejido pancreático.

Las células endocrinas se organizan en agrupaciones microscópicas llamadas islotes pancreáticos. Los islotes constituyen únicamente del 2 al 5% de la masa pancreática total. Fueron identificados por primera vez por Paul Langerhans en 1869, por lo que recibieron el nombre de islotes de Langerhans 10 años después.

Los islotes de Langerhans están rodeados por tejido exocrino. La estructura del islote cambia según la especie: mientras que en roedores es principalmente esférica, en humanos la estructura es menos regular y muy variable en tamaño (50  $\mu\text{m}$ -500  $\mu\text{m}$  de diámetro). Los islotes se distribuyen aleatoriamente en el tejido exocrino pero, sobretodo en roedores, se concentran principalmente en la cola del páncreas. Los islotes están muy vascularizados, reciben 5 veces más aporte sanguíneo que el tejido exocrino adyacente. El flujo sanguíneo se distribuye de la zona central a la periferia de forma que la concentración de insulina modula la secreción de las otras hormonas endocrinas (Figura I.8). Los islotes pancreáticos están considerablemente inervados por nervios parasimpáticos, simpáticos y sensoriales, cuyas fibras entran con los vasos sanguíneos y forman una red periinsular, y/o entran directamente en el islote. Los islotes se distribuyen cerca de los ductos pancreáticos, de donde originariamente provienen. Los vasos de los islotes se distribuyen también próximos a las estructuras ductales. Esta estructura tan compleja, junto con los neurotransmisores identificados en los islotes, es esencial para el control de la secreción endocrina [55].

**Figura I.8.** Irrigación del islote pancreático. La arteriola eferente entra en el islote por un hueco o discontinuidad del manto de células no  $\beta$ , de manera que penetra directamente en el núcleo de la célula  $\beta$ , donde se ramifica en diversos capilares.



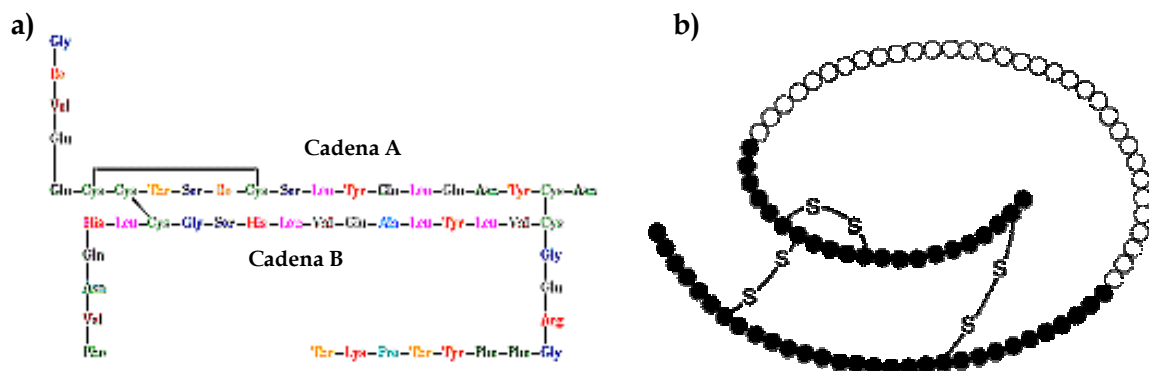
La estructura de los islotes se compone de 4 tipos celulares distintos: las células  $\beta$  secretoras de insulina y que son las más numerosas, formando el 60-80% de la masa del islote; las células  $\alpha$  que producen glucagón y forman el 25% de la masa del islote; las células  $\delta$  que secretan somatostatina y que forman el 2-8% del total de la masa del islote y finalmente las células que contienen el polipéptido pancreático (PP) y que son muy escasas (1-2%) (Figura I.7). Las células endocrinas comparten muchas características con el tejido neuroendocrino. Tienen un núcleo central grande y un citoplasma donde se encuentra toda la maquinaria secretora [55].

Las células  $\beta$  del páncreas se identificaron por primera vez mediante una tinción con plata en 1907. La hormona encontrada en su interior fue denominada isletina o

insulina. Las células  $\beta$  se localizan en agrupaciones conectadas por uniones fuertes (tight junctions) que permiten la secreción coordinada de insulina por las distintas células  $\beta$  dentro del islote. En la estructura general del islote, las células  $\beta$  se localizan en el centro, rodeadas de células no  $\beta$ . Aunque en humanos también podemos encontrar células no  $\beta$  en el centro del islote. La única función fisiológica conocida de las células  $\beta$  es secretar insulina para asegurar que los niveles de glucosa circulante se mantengan dentro de unos estrechos márgenes fisiológicos [55].

La insulina es una hormona polipeptídica y fue descubierta por Sir Frederick Grant y Charles Herbert en 1921 [55]. La insulina transmite una señal anabólica, ya que una vez unida a su receptor, estimula la captación de glucosa y aminoácidos (a.a.), el aumento de la actividad glicógeno sintasa, el aumento general de síntesis de proteínas, así como la disminución de la lipólisis [55].

La estructura de la insulina está formada por dos cadenas: la cadena A (21 a.a.) y la cadena B (30 a.a.). Las 2 cadenas se mantienen unidas por dos puentes bisulfuro. Existe un tercer puente bisulfuro interno, de la propia cadena A (Figura. I.9).



**Figura I.9.** a) Secuencia aminoacídica de la molécula de insulina. b) Estructura primaria de la proinsulina.

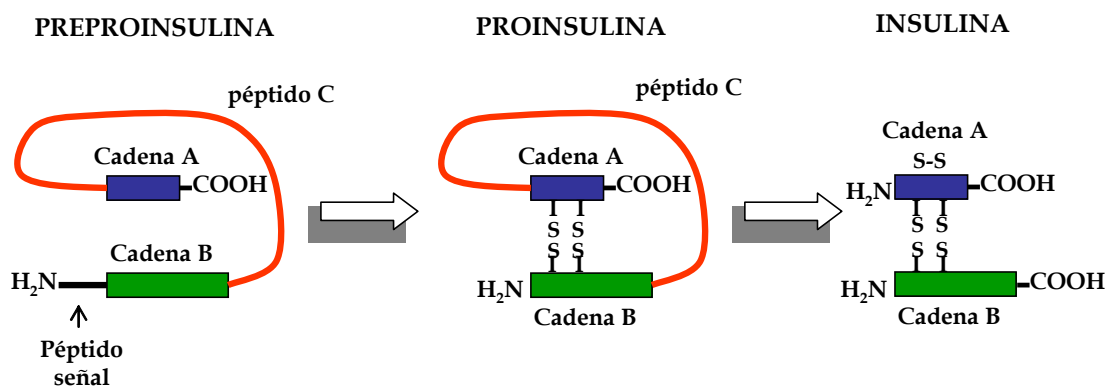
## 2.1 Biosíntesis de la insulina

Inicialmente se sintetiza el precursor de la insulina, la preproinsulina, la cual se transforma en la proinsulina, después de una acción proteolítica y la formación de puentes disulfuro. Finalmente la proinsulina, a su vez, escinde la insulina, la hormona biológicamente activa, después de una última reacción proteolítica (Figura. I.10) [56].

La preproinsulina humana está constituida por una única cadena polipeptídica de 86 a.a. que contiene la secuencia de proinsulina y un péptido señal N terminal de 24 a.a. [56].



La molécula de proinsulina es una única cadena polipeptídica formada por la cadena B, por la cadena A y por el péptido C. Este último péptido une la cadena A y la cadena B formando la molécula de insulina final. La molécula de proinsulina ya contiene los puentes disulfuro que conforman la molécula de insulina definitiva. La conversión de la proinsulina a insulina se lleva a cabo por la rotura de la unión de dos aminoácidos dibásicos en la unión de la cadena B - péptido C y en la unión péptido C - cadena A. Con ambas roturas, se libera el péptido C y las dos cadenas A y B unidas por sendos puentes disulfuro y perfectamente alineadas, que forman ya la molécula de insulina biológicamente activa. La insulina forma complejos hexaméricos con el Zn [56].



**Figura I.10.** Biosíntesis de la insulina a partir de sus precursores, la preproinsulina y la proinsulina.

La regulación de la insulina a corto plazo ocurre a nivel de la secreción de dicha hormona ya almacenada. Sin embargo, la adaptación a cambios glicémicos a largo plazo, implica cambios en la transcripción del gen de la insulina, en la traducción de su mRNA y en el procesamiento de la proinsulina a insulina [56].

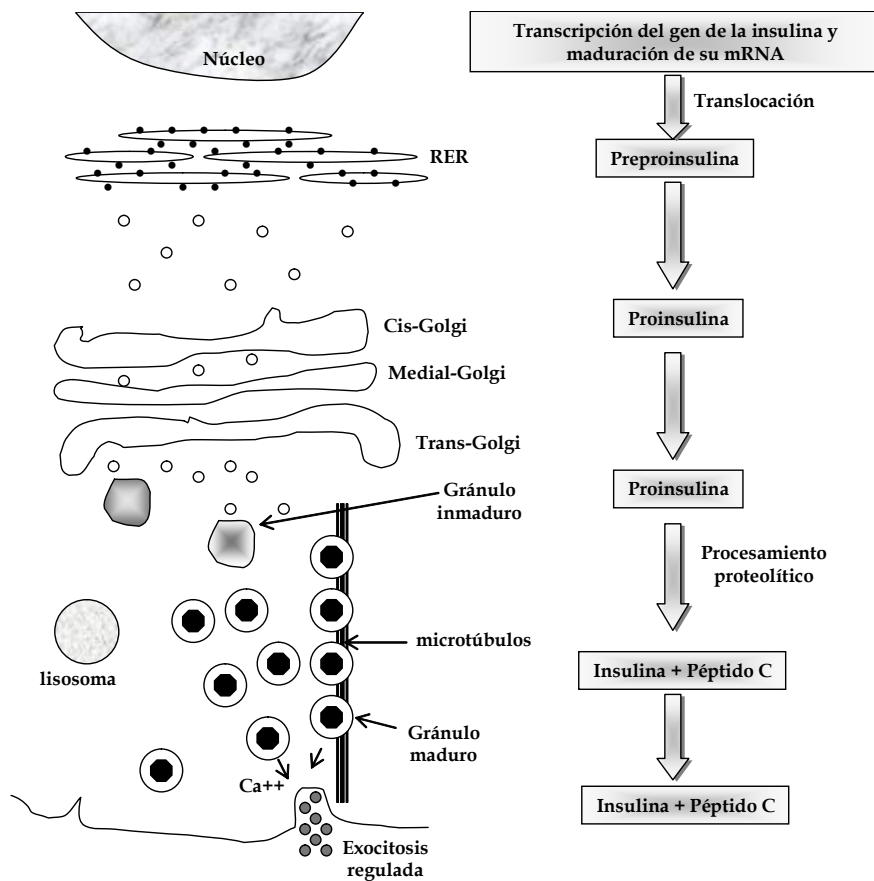
La expresión del gen de la insulina es prácticamente exclusivo de la célula  $\beta$ . Existe una alta homología de secuencias entre especies. En humanos el gen que codifica para la insulina está localizado en el cromosoma 11, mientras que los roedores cuentan con dos genes no alélicos que codifican para la insulina (I y II). La insulina II se localiza en el cromosoma 7 y es la ortóloga humana, mientras que la insulina I se localiza en el cromosoma 19, probablemente como resultado de la duplicación del gen de la insulina II [56].

La transcripción del gen de la insulina es un proceso altamente controlado. Adicionalmente, el mRNA de la preproinsulina es muy estable en las células  $\beta$

pancreáticas, llegando a ser su vida media de hasta 36h. En condiciones normales existe una reserva de mRNA de preproinsulina disponible para ser traducido [56].

El primer paso en la biosíntesis de insulina es la traducción del mRNA de la preproinsulina, del mismo modo que ocurre en la mayoría de mRNAs de células eucariotas [56]. En el RER (retículo endoplasmático rugoso) se escinde el péptido N terminal de la preproinsulina, dejando la proinsulina libre. En el lumen del RER, se lleva a cabo el correcto plegamiento de la proinsulina para la correcta alineación de las cadenas y la correspondiente formación de los puentes disulfuro [56]. Una vez la proinsulina ha llegado al RER y se ha plegado correctamente, puede ser llevada mediante vesículas de transporte al aparato de *cis*-Golgi mediante un proceso ATP-dependiente en el que se requiere además de una red de microfilamentos y microtúbulos, cofactores como el ión Ca, la hidrólisis de GTP y algunas proteínas citosólicas [57-60]. Eventualmente, la proinsulina sintetizada se acumula en la red *trans*-Golgi (TGN) en zonas recubiertas de clatrina, que son los lugares de biogénesis de los gránulos- $\beta$  secretores. Los gránulos inmaduros formados de novo emergen de una región particular del TGN. El proceso de biogénesis de los gránulos  $\beta$ , requiere ciertas condiciones: medio ácido luminal (PH=6,5) [61], Ca<sup>2+</sup> [61], ATP [62], hidrólisis de GTP [63], proteínas citosólicas [64-66] y proteínas fosforiladas en tirosina [67] (Figura I.11). La clatrina ejerce su función en la eliminación de proteasa de los gránulos maduros, sin embargo, la clatrina no está implicada ni en la selección o procesamiento de la proinsulina, ni en la secreción regulada de los gránulos secretores [68]. Una vez el gránulo- $\beta$  recubierto de clatrina se ha liberado del TGN, tiene lugar la maduración de los gránulos con la conversión de proinsulina a insulina, la acidificación intragranular, la pérdida de la clatrina y la formación de cristales hexaméricos de insulina [69].

La conversión de proinsulina a insulina está catalizada por 2 endopeptidasas dependientes de Ca<sup>2+</sup> (PC2 y PC3) [70-72] y por una exopeptidasa dependiente de Ni<sup>2+</sup> (CP-H) y tiene lugar principalmente en los gránulos inmaduros. La molécula de insulina humana tiene dos lugares dibásicos, el Arg31-Arg32, donde la PC3 tiene mayor afinidad, y el Lys64-Arg65 donde la PC2 tiene mayor afinidad. Estos dos lugares limitan la rotura endoproteolítica de la proinsulina generando el péptido C y la insulina madura. La CP-H se encarga de la eliminación exopeptídica de los aminoácidos básicos expuestos de novo. El orden de corte es indiferente, si bien se ha observado una mayor frecuencia de actuación de la PC3 seguida de la PC2 [73, 74].



**Figura I.11.** Biología celular del procesamiento y tránsito de la proinsulina.

La biosíntesis de proinsulina está controlada por ciertos nutrientes, neurotransmisores y hormonas a nivel traduccional, pero de todos ellos la glucosa es probablemente el más relevante [56].

Un gránulo maduro puede ser retenido desde horas hasta días antes de ser excitado a la membrana plasmática. El contenido de insulina de la célula  $\beta$  es bastante constante. Cuando se libera insulina debido a un estímulo, los niveles son rápidamente reestablecidos mediante la biosíntesis de insulina de novo. Si los niveles de insulina sobrepasan los niveles normales o si el gránulo de insulina no es excitado en varios días, es degradado por vía lisosomal mediante un proceso llamado crinofagia [75].

## 2.2 La secreción de insulina

La célula  $\beta$  es capaz de detectar los niveles de glucosa extracelulares y activar la secreción de insulina mediante un complejo entramado de nutrientes, hormonas y señales neuronales. Como resultado de un estímulo de secreción, los gránulos se unen a la membrana plasmática liberando los gránulos de insulina al espacio extracelular, donde los hexámeros se disocian y la insulina se difunde en los capilares del islote [76].

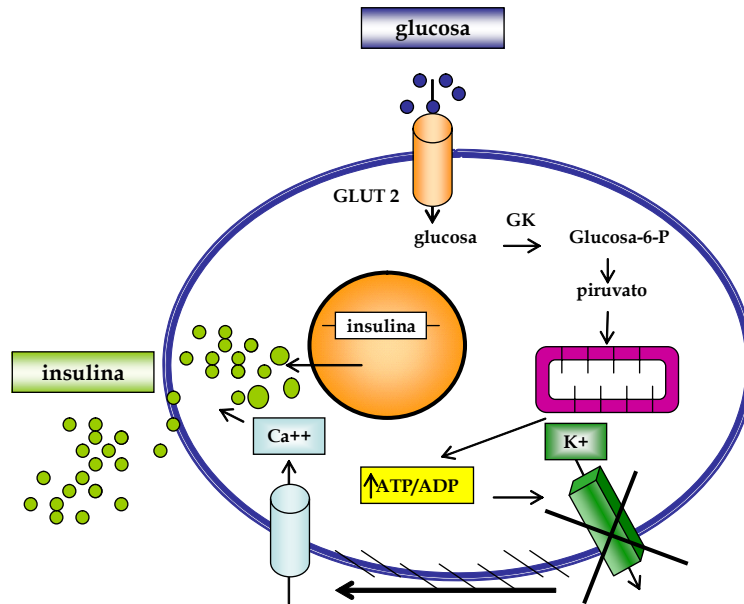
La insulina se almacena en gránulos secretores en las células  $\beta$ . El gránulo secretor contiene además de la insulina, elevadas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ , enzimas proteolíticas como la convertasa 1/3 y 2 y la carboxipeptidasa, la cromogranina y el péptido C. La célula  $\beta$  del ratón tiene aproximadamente 13.000 gránulos secretores de insulina y cada gránulo contiene 200.000 moléculas de insulina [76].

Dada la importancia funcional de la insulina como regulador de las fluctuaciones de glucosa en sangre dentro de un estrecho margen, no es extraño que la secreción de insulina esté sujeta a un estricto control. Dos vías controlan la secreción de insulina inducida por glucosa: la vía desencadenante y la vía de amplificación [77].

**Vía desencadenante:** Cuando la concentración extracelular de glucosa aumenta, el metabolismo de la célula  $\beta$  se acelera. La glucosa llega al interior de la célula  $\beta$  a través del transportador de membrana GLUT2 [78], allí es fosforilada por la glucocinasa (GK) iniciando el proceso de la glucólisis [79]. Una vez obtenido el producto final de la glucólisis, el piruvato, éste entra en la mitocondria donde es metabolizado mediante el ciclo de Krebs, transfiriéndose así equivalentes reductores a la cadena respiratoria. La cadena respiratoria causa la hiperpolarización del potencial de membrana mitocondrial y la generación subsiguiente de ATP. El ATP es transferido al citosol de la célula, aumentando la proporción ATP/ADP, lo cual provoca el cierre de los canales de K dependientes de ATP ( $K_{\text{ATP}}$ ), despolarizándose la membrana de la célula. Como consecuencia de esta despolarización, se abren los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje aumentando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y activando, por tanto, la exocitosis de la insulina [76] (Figura I.12).

**Vía amplificadora:** Además de las señales desencadenantes, la glucosa también produce señales que amplifican la acción del calcio en el proceso excitotico. Este concepto, fue establecido mediante experimentos que mostraban que, siempre que la concentración de calcio intracelular sea alta, la glucosa puede aún aumentar la secreción de insulina, aunque los canales de  $\text{K}^{+}$  dependientes de ATP no se puedan cerrar o estén completamente cerrados ya [80-83]. Los efectos de la glucosa pueden ser revocados por diazóxido, el cual previene la clausura de los canales de  $\text{K}^{+}$  dependientes de ATP, la despolarización de la membrana y por tanto, el aumento de la concentración de calcio intracelular. Sin embargo, incluso con la presencia del diazóxido, la membrana de la célula  $\beta$  puede despolarizarse y aumentar la concentración de  $\text{K}^{+}$  extracelular, suficiente para aumentar la concentración de calcio intracelular, produciendo una señal que induce la secreción de insulina en ausencia

de glucosa [80]. La vía amplificadora también requiere el metabolismo de la glucosa, pero ni el mensajero intracelular, ni el efector final han sido identificados. La acción amplificadora de la glucosa confiere una eficacia mayor de la señal desencadenante de la exocitosis.



**Figura I.12.** Mecanismo de secreción de insulina por la célula  $\beta$  pancreática por la vía desencadenante.

El control óptimo de la concentración de glucosa en sangre o glicemia depende tanto de los cambios en la producción y secreción de insulina por las células  $\beta$ , como de la capacidad de dicha célula  $\beta$  de disponer de grandes reservas de insulina [84] para poder aumentar su secreción de manera importante después de una ingesta. Por todo lo anteriormente expuesto es imprescindible una fina regulación de la masa  $\beta$  pancreática en función de las distintas necesidades del organismo.

### 3 La masa $\beta$ -celular. Replicación de la célula $\beta$ pancreática

Es muy importante que la masa de células  $\beta$  existente esté regulada por los niveles de glucosa y por otros factores hormonales, para asegurar la normoglicemia. Debido a los niveles cambiantes de glucosa, la masa de células  $\beta$  es dinámica y procesos como la proliferación, la neogénesis y la apoptosis aseguran la adecuación de la masa de células  $\beta$  a cada momento [84] (Figura I.13).

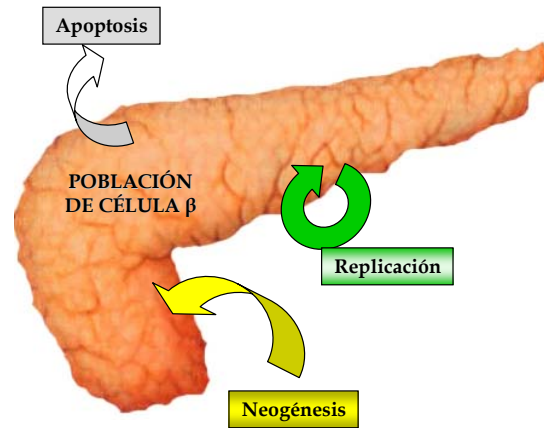


Figura I.13. Dinámica de la célula  $\beta$

En roedores, el número de células  $\beta$  en el páncreas parece ya determinado alrededor del último cuarto de la gestación fetal y en los primeros días después del nacimiento, cuando se dobla cada día la población de células  $\beta$  existente. La masa principal de células  $\beta$  se desarrolla en un proceso de neogénesis a partir de células de origen endodérmico. El proceso de neogénesis es el proceso por el cual se forma una nueva célula  $\beta$  a partir de la diferenciación de una célula precursora que no expresa insulina. Este proceso dura hasta pocos días después del nacimiento. La posterior diferenciación de los distintos linajes celulares en el páncreas, es resultado de cambios muy específicos en programas de expresión génica. La transición hacia un tipo celular u otro depende de la expresión diferencial de determinados factores de transcripción (Figura I.14) [85]. Se ha descrito parte de la cascada de diferenciación hacia célula  $\beta$ , pero existen muchos puntos aún por resolver [84].

La adaptación postnatal de la célula  $\beta$  en respuesta a las demandas metabólicas se lleva a cabo mediante la existencia de un equilibrio dinámico resultante del balance alcanzado entre los procesos de replicación y apoptosis de la célula  $\beta$ . Además, la masa de células  $\beta$  parece aumentar por un aumento del tamaño de los islotes y no por la generación de nuevos islotes. Sin embargo la proliferación postnatal de las células  $\beta$  es muy baja. Si la población de célula  $\beta$  perinatal es subóptima (por ejemplo por un déficit

en la nutrición durante la gestación), la replicación postnatal no es suficiente para compensar esta deficiencia en la edad adulta [84]. Por tanto, la etapa fetal es crucial para el establecimiento de una masa de célula  $\beta$  suficiente para cubrir las necesidades del organismo a lo largo de toda su vida [84].

Se conocen distintas moléculas que de un modo u otro intervienen en la regulación de la masa  $\beta$  pancreática. Por una parte la glucosa y ciertas hormonas como la insulina, el lactógeno placentario (durante el embarazo) y el GLP-1 (Glucagon-like peptide-1). Por otra parte factores de crecimiento como IGF-I y II (insulin growth factor I y II), PDGF (platelet-derived growth factor), EGF (epidermal growth factor), HPG (Hepatocyte Growth Factor) y PTHrP (Parathyroid Hormone-related Protein) [84, 86]. En la última década se ha visto que dichos mitógenos pueden aumentar de un modo significativo la masa de célula  $\beta$ , bien actuando vía  $\text{IGF} \rightarrow \text{IGFR1} \rightarrow \text{IRS-2} \rightarrow \text{PI3-kinasa} \rightarrow \text{AKT}$ , bien vía el receptor de la hormona de crecimiento (GHR) o bien vía el receptor de prolactina. Sin embargo, las dianas distales en estas vías de señalización permanecen confusas y no se sabe prácticamente nada de las señales que terminan por influenciar a la fase G1 del ciclo celular de la célula  $\beta$  [86].

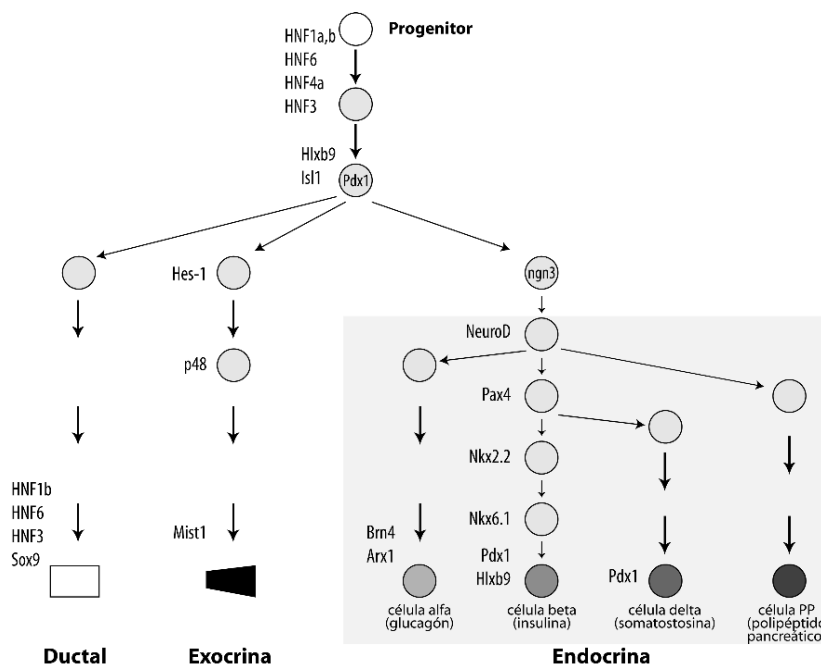
El proceso de regeneración de masa  $\beta$  pancreática por transdiferenciación (cambio fenotípico de un estado de diferenciación a otro) o mediante la tecnología de diferenciación de células troncales (stem cells) es otro proceso que se estado explorando últimamente. A pesar de los esfuerzos realizados durante estos últimos 4 años, aún no se disponen de los medios para obtener eficientemente células  $\beta$  funcionales mediante la diferenciación a partir de células madre. Tampoco se disponen de resultados que confirmen la existencia de células troncales en el páncreas adulto que pudiesen diferenciarse a células  $\beta$  en condiciones fisiológicas normales. La dificultad de elección del material de partida apropiado y el desconocimiento de la vía exacta de diferenciación de la célula  $\beta$ , son dos de los principales motivos que impiden avanzar con relativa rapidez en este campo [87].

Recientemente se ha mantenido cierto debate sobre el origen de las células que contribuyen al mantenimiento de la masa  $\beta$  pancreática. Dor et al. [88], sugieren mediante una técnica de seguimiento del linaje celular, que no hay neogénesis durante la renovación normal de las células  $\beta$  ni durante el crecimiento de la masa  $\beta$  celular para satisfacer la demanda, sino que es la replicación de la propia célula  $\beta$  la que tiene una función más destacada. Además, el citado artículo sugiere que las células que

expresan insulina existentes en los animales jóvenes son las encargadas de proporcionar la insulina también durante la etapa adulta [88].

Por otro lado, la aparición de otro trabajo, más recientemente, añade más controversia al concepto de proliferación y renovación de la célula  $\beta$ . Teta et al. [89] han realizado un estudio de renovación de célula  $\beta$  en animales adultos a largo plazo. Para ello, han administrado durante varios meses Bromodeoxiuridina (BrdU) en agua de bebida a ratones de un año de edad. Teta et al comprobaron que estos animales tienen unos niveles de replicación extremadamente bajos (1 de cada 1400 células tiene evidencias de replicación en 24 horas), con pocas evidencias de renovación, siendo en algunos animales incluso inexistente [89].

Ante estos datos, se podría pensar que la neogénesis de la célula  $\beta$  sería un proceso relevante en etapas prenatales de desarrollo y que la proliferación tendría un papel más destacado en la etapa adulta, si bien con la edad, esta capacidad de proliferación iría disminuyendo.



**Figura I.14.** Cascada de factores de transcripción durante el desarrollo del páncreas del ratón. Adaptado de [85].

### 3.1 Proliferación de la célula $\beta$ . El ciclo celular de la célula $\beta$

Las células  $\beta$  del páncreas, al igual que otros tipos celulares, siguen las distintas fases del ciclo celular. Ya en 1982 Swenne et. al [90] sugirieron que la célula  $\beta$  era capaz de replicarse. Mediante ensayos de proliferación con timidina tritiada de islotes en



cultivo sincronizados con hidroximiurea, llegaron a la conclusión que el ciclo celular de la célula  $\beta$  era de 14.9 h (2.5 h de la fase G1, 6.4 en la fase S, 5.5 h en G2 y 0.5 h en M). Además, Swenne et. al observaron también que la progresión del ciclo celular no cambia a distintas concentraciones de glucosa.

El crecimiento de la masa  $\beta$  celular viene determinado por el número de células que entran en ciclo y no por el aumento de la velocidad del ciclo. La célula termina un ciclo a una velocidad bastante elevada. Sin embargo, el número de células en ciclo es muy bajo. Sólo un 3% del total de la masa  $\beta$  celular se replica en edad adulta, frente a un 10% en la etapa fetal. A pesar de esta dramática reducción de masa  $\beta$  potencialmente replicativa, existe un reservorio de células en fase G0 susceptibles de entrar en ciclo y que podrían aumentar el número de células en ciclo si el organismo así lo requiriese, indicando que la mayoría de células  $\beta$  no están en un estado G0 irreversible [91].

Durante la etapa fetal, la célula  $\beta$  exhibe una baja respuesta replicativa a glucosa, mientras que, en la fase tardía de la etapa fetal, la glucosa es un estímulo muy potente para la replicación de la célula  $\beta$ . La glucosa estimula la entrada de la célula  $\beta$  en ciclo desde la fase G0 [91].

La primera observación del impacto de la alteración del ciclo celular en la proliferación de la célula  $\beta$  surge de estudios realizados con el antígeno-T de cadena larga del virus SV40, conocido por promover proliferación por inactivación de p53 y de la pRb. En dicho estudio, se sobreexpresó el antígeno-T específicamente en célula  $\beta$  y se observó que ello producía un aumento de la proliferación de célula  $\beta$  y una hiperplasia de islotes derivando en el desarrollo de insulinomas [92]. Además, los animales deficientes en p53 y en pRb exhibían hiperplasia en el islote y tumores [92], si sólo una de las 2 proteínas (p53 o pRb) estaba afectada, la masa de célula  $\beta$  se mantenía intacta [93, 94].

Estas observaciones, sin duda, inducen a pensar que la proliferación de las células del islote pancreático está íntimamente regulada a nivel de la fase G1 del ciclo celular.

### **3.1.1 Cdk4 como molécula clave en la proliferación de la célula $\beta$**

Continuando con la línea de investigación que parecía confirmar la importancia de la fase G1 en la proliferación de la célula  $\beta$ , en 1999 Rane et. al [42] caracterizaron el modelo murino genoanulado para la Cdk4 (Cdk4<sup>neo/neo</sup>). Este modelo exhibe diabetes y cetoacidosis a los 2 meses de edad debido a una clara hipoplasia de la célula  $\beta$  [42]. Los niveles de insulinemia están reducidos en un 90% y la glicemia está de 2 a 3 veces

aumentada con respecto a los hermanos de genotipo salvaje (WT), además presentan glucosuria y cetonuria.

Los análisis histológicos llevados a cabo en los ratones deficientes en Cdk4 revelan una deformidad y una reducción severa en el tamaño y en el número de los islotes en la etapa adulta. El examen morfométrico muestra un defecto selectivo en el desarrollo del páncreas endocrino de los animales genoanulados comparado con el de los hermanos WT. El área de islote por páncreas está reducida en el caso de los animales genoanulados, la proporción islote:páncreas o islote:acinos pancreáticos está también disminuido, mientras que la proporción acinos:islote está aumentada.

El tejido pancreático muestra una importante reducción de los niveles de insulina en los islotes de los ratones genoanulados, mientras que los niveles de glucagón y somatostatina son normales [42]. Por tanto la disrupción de la Cdk4 en este modelo tiene un marcado efecto tejido específico en célula  $\beta$ , efecto que es también autónomo de la célula  $\beta$ , ya que el restablecimiento de la expresión de la Cdk4 únicamente en célula  $\beta$  revierte el fenotipo insulinopénico de los ratones genoanulados y los ratones se tornan normoglicémicos [95].

A nivel funcional cabe destacar que los animales Cdk4<sup>neo/neo</sup> presentan intolerancia a la glucosa y una baja sensibilidad a la insulina a las 4 y 8 semanas de edad [96].

La Cdk4 no empieza a expresarse hasta etapas tardías del desarrollo, E17.5, cuando la célula empieza a proliferar, por tanto, la actividad de la Cdk4 es dispensable durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, la función de Cdk4 es esencial en células pancreáticas diferenciadas [95].

Existe una evidencia experimental que confirma la importancia del complejo ciclina D2-Cdk4 en la progresión del ciclo celular. El primer modelo genoanulado descrito para la ciclina D2 exhibe intolerancia a la glucosa debido a una dramática reducción en el número de células  $\beta$  y no en su tamaño. Las células  $\alpha$  también se ven afectadas por la ausencia de la ciclina D2 reduciendo su número. Este déficit de Ciclina D2 no es contrarrestado por ninguna otra ciclina durante las primeras semanas de vida del animal, que es cuando la célula  $\beta$  tiene la tasa más elevada de replicación [97]. Sin embargo a partir de las 8 semanas empieza a detectarse Ciclina D1. En ningún caso se perciben niveles de ciclina D3 [97].

Posteriormente se ha generado otro modelo genoanulado para la ciclina D2, el cual muestra también intolerancia a la glucosa, sin embargo, no es hasta los 9-12 meses de edad que el ratón desarrolla diabetes. En este caso, la ciclina D1 está ejerciendo una

función compensatoria de la falta de ciclina D2, lo cual explicaría el retraso en la aparición de la diabetes respecto al primer modelo genoanulado descrito. Los animales genoanulados para la ciclina D2 y heterocigotos para la ciclina D1 (ciclina D2  $-/-$  ciclina D1  $+/-$ ) padecen una diabetes severa a los 3 meses de edad. La variación en el fenotipo de estos dos modelos se atribuye a una diferencia en el fondo genético [38]. Más adelante se ha observado que los ratones deficientes en E2F1 y E2F2 desarrollan diabetes debido a una reducción del número y tamaño de los islotes [98].

La ciclina D1 parece ser relevante en la replicación de islotes humanos pancreáticos, ya que la sobreexpresión adenoviral de ciclina D1 en islotes pancreáticos humanos provoca la proliferación de dichos islotes *in vitro* [99].

### 3.1.1.1 La hiperplasia de célula $\beta$ en el modelo knockin Cdk4R24C

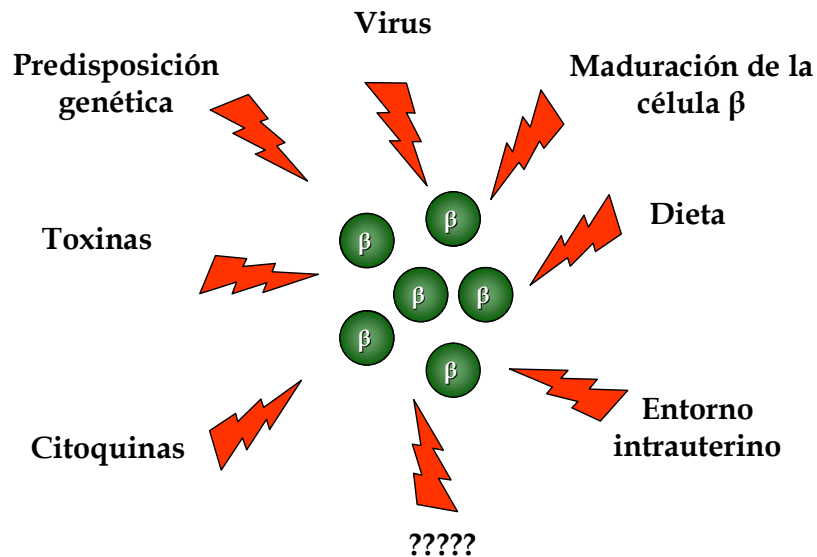
El modelo murino genomodificado (*knockin*) Cdk4R24C (Cdk4<sup>R24C/R24C</sup>) se caracteriza por una hiperactivación de la molécula Cdk4, debido a la sustitución de una arginina (R) por una cisteína (C) en el a.a. 24, lo cual impide la unión de la Cdk4 a la familia de inhibidores INK4 (ver apartado 1.2.3). Los animales Cdk4<sup>R24C/R24C</sup> presentan hiperplasia de célula  $\beta$ , que parece dependiente de dosis, ya que los individuos heterocigotos para dicha mutación también presentan cierta hiperplasia. Los análisis morfométricos muestran que hay un incremento de hasta 7 veces en el área del islote de los animales genomodificados, respecto a los WT. Además la proporción islote:páncreas e islote:acinos está aumentada en los animales Cdk4<sup>R24C/R24C</sup>. Esta hiperplasia es principalmente de células  $\beta$ , ya que los niveles de glucagón y somatostatina se mantienen semejantes a los de la población WT. Contrariamente a lo esperado, los análisis por RT-PCR semicuantitativa mostraron ausencia de diferencias significativas en los niveles de expresión de los transcritos de preproinsulina I y II. Sin embargo, los páncreas de los ratones Cdk4<sup>R24C/R24C</sup> presentan niveles disminuidos de somatostatina y polipéptido pancreático respecto a los páncreas de los animales WT. HNF-1 $\alpha$  está también aumentado mientras que la glucokinasa y HNF-4 $\alpha$  no varían [96].

La sobreexpresión de la Ciclina D1 en células  $\beta$  causa hiperplasia en la célula  $\beta$  [100]. Estos datos corroboran de nuevo la vital importancia que tiene la Cdk4 en la proliferación de la célula  $\beta$  pancreática. Estudiar el posible efecto de esta hiperplasia  $\beta$  pancreática en la funcionalidad de la célula  $\beta$  es uno de los objetivos de esta tesis.

## 4 Diabetes Mellitus de tipo 1 (DMT1)

La diabetes *mellitus* de tipo 1 (DMT1) es una enfermedad poligénica que se caracteriza por la destrucción autoinmune, mediada por los linfocitos T, de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas [101, 102]

Además de la influencia de los factores genéticos, también los factores ambientales tienen una función importante en condicionar el riesgo a padecer la enfermedad (Figura I.15).



**Figura I.15.** La DMT1 es una enfermedad multifactorial, son muchos los factores que pueden inducirla.

Pero para entender la DMT1 como enfermedad autoinmune, es preciso entender antes ciertos conceptos de inmunidad general.

La inmunidad es fundamental para la supervivencia del individuo y de la especie. El sistema inmune tiene el papel de proteger a los individuos de cualquier elemento extraño potencialmente patogénico. Este proceso de protección incluye: la distinción por parte de los linfocitos entre los agentes infecciosos y el resto de elementos propios, la eliminación del elemento extraño y la reparación de los daños ocasionados [103, 104]. Existen dos vertientes en los procesos inmunes: la inmunidad innata y la inmunidad adquirida. Es en la inmunidad adquirida que se centra este trabajo.

Con el fin de optimizar la activación y el reconocimiento en la respuesta inmune, la mayoría de células del sistema inmunitario se concentran en órganos y tejidos definidos donde también se localizan ciertos antígenos que han llegado hasta allí [103, 104]. Existen dos tipos de órganos linfoides:

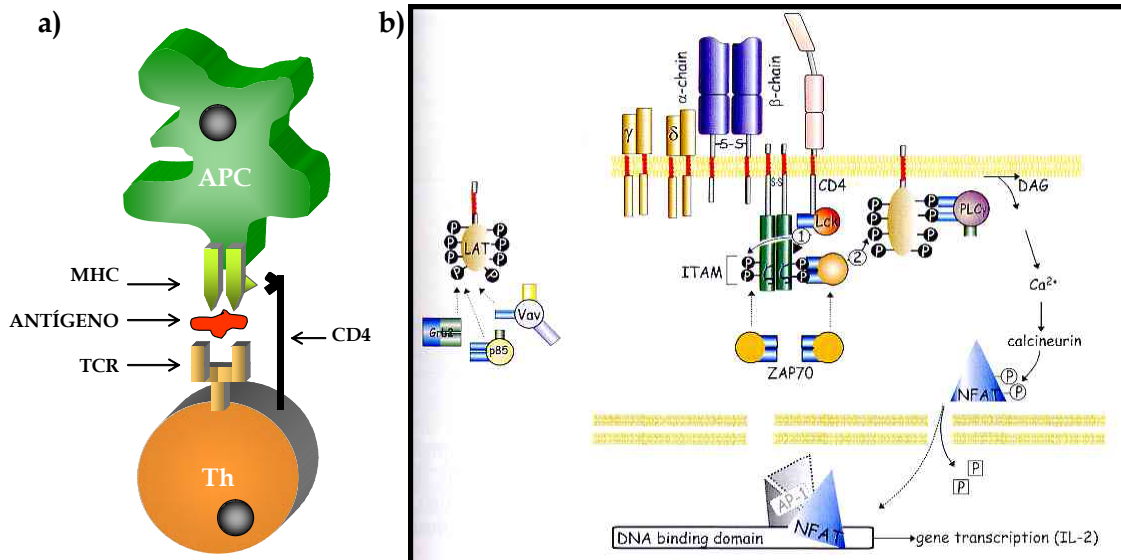
- (a) Los primarios, que son el timo y la médula ósea y se encargan de la maduración de los linfocitos a partir de precursores hematopoyéticos.
- (b) Los secundarios que son, entre otros, el bazo y los nódulos linfáticos. Recolectan los linfocitos maduros de la periferia y facilitan su interacción con otras células inmunocompetentes para desarrollar la respuesta inmunitaria adecuada a cada situación.

La respuesta inmune se desarrolla en tres fases: (a) Fase cognitiva: reconocimiento del antígeno; (b) Fase de activación: proliferación y diferenciación de los linfocitos; (c) Fase efectora: producción de citoquinas, citolisis y eliminación del patógeno. Generación de anticuerpos y células memoria.

Existen dos tipos de linfocitos implicados en la respuesta inmune:

- (a) **Los linfocitos B (CD19)**, encargados de producir anticuerpos que reconocerán antígenos no propios y de presentar antígenos a los linfocitos T. Se generan en la médula ósea.
- (b) **Los linfocitos T**, encargados de la producción de las citoquinas responsables de activar los macrófagos. Se diferencian en el timo. Reconocen los antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Dentro de los linfocitos T existen dos subtipos:
  - **Linfocitos T helper o colaboradores (CD4)**. Reconocen los antígenos exógenos de la célula, presentados en el contexto del MHC-II. En función del patrón de citoquinas que secreten se diferencian **TH1** (secretan citoquinas con un perfil inflamatorio como la IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ ...) y **TH2** (secretan citoquinas con un perfil alérgico como la IL-4, IL-5 y IL-10).
  - **Linfocitos citotóxicos (CD8)**. Reconocen los antígenos citosólicos, como pueden ser las proteínas virales en el contexto del MHC-I. Actúan mediante la lisis celular.

Para que un antígeno sea reconocido como extraño y desencadene la respuesta inmunológica es necesario que las células presentadoras de antígeno (Antigen Presenting Cells=APCs) lo presenten a los linfocitos T (Figura I.16.a).



**Figura I.16.** Esquema de **a)** la presentación de un antígeno por una APC, a un linfocito T CD4; **b)** la cascada intracelular de señalización por el receptor de célula T (TCR).

Una vez se ha producido la presentación del antígeno por parte de la APC al linfocito T mediante el TCR, se produce una cascada de activación del linfocito (Figura I.15.b). El complejo del receptor de célula T y co-receptor (en la figura el CD4) están asociados con las proteínas de la familia Src de proteínas kinasas, Fyn y Lck, respectivamente. Una vez se ha producido la presentación MHC-restringida del antígeno por parte a la APC al linfocito T mediante la interacción con el TCR, se produce la cascada de activación del linfocito (Figura I.16.b), que empieza por la fosforilación de las tirosinas de los motivos del TCR ITAMS (immunoreceptor based tyrosine-activation motifs). Las proteínas kinasas encargadas de dicha fosforilación son la Lck y Fyn. Una vez los motivos ITAMS, situados en la cola citoplásmica del receptor, están fosforilados, reclutan la proteína quinasa ZAP-70 ( $\zeta$  chain-associated protein). ZAP-70 se caracteriza por tener 2 dominios SH2, uno en la parte carboxi-terminal y el otro en la parte amino-terminal, que se unirán a los motivos ITAM por 2 fosfotirosinas. ZAP-70, una vez unida al dominio ITAM, es activada por la Lck. La activación de ZAP-70 por fosforilación conduce a 3 importantes vías de señalización. La vía del DAG (diacilglicerol),  $Ca^{2+}$  y la proteína quinasa C (PKC); la vía del fosfatidil inositol trifosfato (IP3); y la vía de MAP-K y Ras [104].

A parte de los procesos de reconocimiento de antígenos extraños y desencadenamiento de una respuesta inmunológica contra ellos, el sistema inmune también tiene procesos de tolerancia inmunológica. La tolerancia inmunológica consiste en el desarrollo de no reactividad en los tejidos linfoides a cierto antígeno, que

en otras circunstancias induciría inmunidad. Es precisamente la tolerancia frente a componentes propios lo que nos protege de las enfermedades autoinmunes.

Existen dos tipos de tolerancia, la central y la periférica (Figura I.17) [103, 104].

**Tolerancia Central:** Cuando las células T y B maduran en los órganos hematopoyéticos como el timo y la médula ósea, respectivamente, las células que adquieren receptores que reconocen antígenos propios son eliminadas físicamente por un mecanismo apoptótico de selección negativa que recibe el nombre de delección clonal [103, 104].

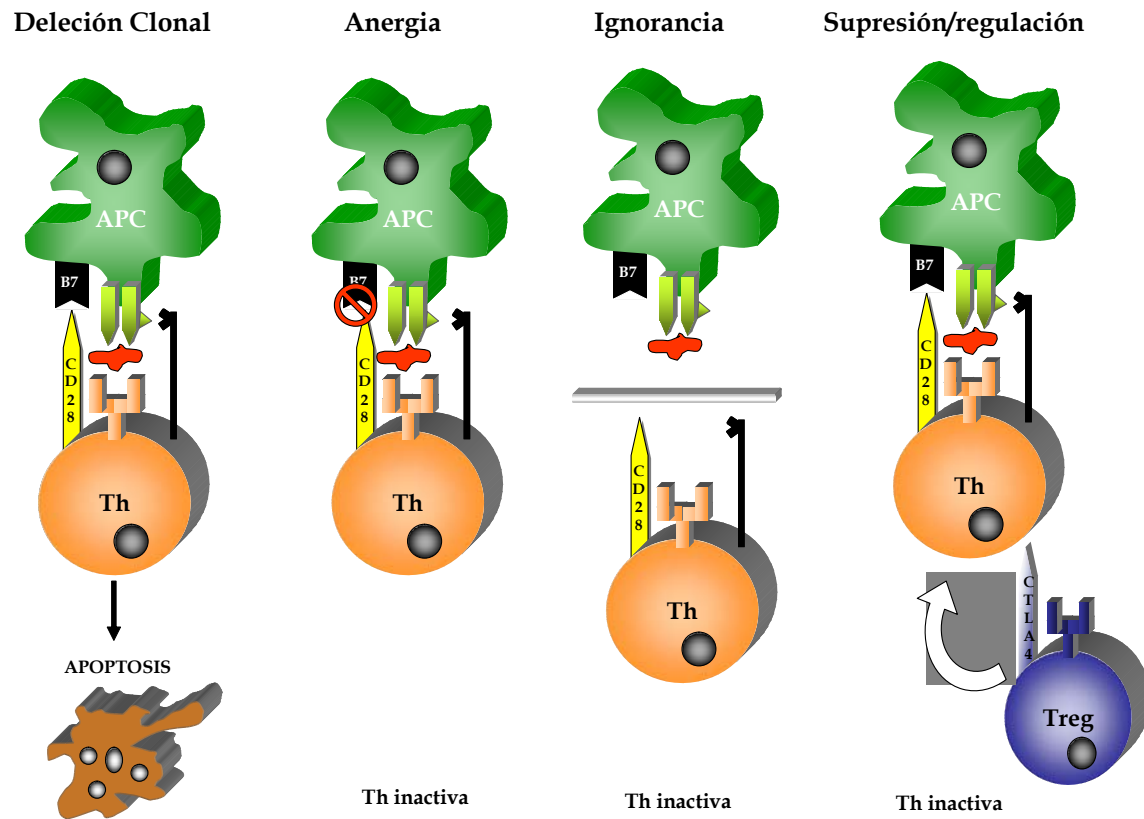
**Tolerancia periférica:** Es el mecanismo que compensa los defectos de la tolerancia central eliminando las células que han escapado de la misma. Existen principalmente 3 tipos de mecanismos que materializan la tolerancia periférica:

- (a) **La anergia.** Se define como la falta de estimulación de los linfocitos T por parte de las APCs por ausencia de coestimulación. Los linfocitos no proliferan ni producen citoquinas en respuesta a un estímulo.
- (b) **La ignorancia inmunológica.** Es un fenómeno pasivo que se produce cuando las células T no se activan por estar físicamente separadas del antígeno diana.
- (c) **La supresión/regulación.** Llevada a cabo por un tipo de linfocitos T, las células reguladoras, que tienen como función mantener la homeostasis del sistema inmunitario y por tanto, participan en la preservación de la tolerancia activa hacia los autoantígenos. Recientemente se han descubierto muchos tipos distintos de células reguladoras, las más caracterizadas probablemente sean las CD4+ CD25+ [105].

Existen procesos etiopatológicos en los que alguno de estos mecanismos de tolerancia no realiza su función correctamente y nuestro organismo realiza un ataque inmunitario contra sí mismo, dando como resultado una enfermedad autoinmune.

Se define autoinmunidad como el proceso mediante el cual el sistema inmunitario reconoce un antígeno propio como extraño, generando anticuerpos y una respuesta inmunitaria contra el propio organismo [104, 106].

La lesión autoinmune puede ser puntual, como sucede cuando anticuerpos específicos y las células autoinmunes destruyen un solo tipo celular (las células  $\beta$  del páncreas en la diabetes mellitus tipo 1), puede estar dirigida frente a un sistema de órganos, como el sistema nervioso central en la esclerosis múltiple, o puede atacar múltiples sistemas como ocurre en el lupus eritromatoso sistémico [104, 106].



**Figura I.17.** Mecanismos de tolerancia

Durante la presente tesis trataremos la diabetes de tipo 1, donde se produce un ataque autoinmune linfocito T dependiente hacia las células  $\beta$  pancreáticas.

La causa del ataque autoinmune hacia la célula  $\beta$  sigue siendo una incógnita. Varios autoantígenos han sido identificados y aunque parece que existe un defecto en la regulación de la función y respuestas inmunológicas, el defecto inmune sigue sin desvelar porqué el proceso autoinmune afecta específicamente a la célula  $\beta$ .

Se ha sugerido que las personas diabéticas tendrían una célula  $\beta$  más susceptible al ataque autoinmune [107]. Existen evidencias genéticas que apoyarían esta hipótesis. En primer lugar, existen loci de susceptibilidad a diabetes (IDDM) relacionados con la célula  $\beta$ . Es el caso del IDDM2 que codifica para el gen de la insulina, se ha descrito que anteriormente al locus de codificación, existen unas secuencias VNTR (Variable number of tandem repeats) repetidas en tándem, que en el caso de tener un número bajo de repeticiones predispone a la enfermedad [108].

Ciertas alteraciones metabólicas, tanto perinatales como postnatales, también influyen en la predisposición a padecer DMT1. A nivel perinatal, una excesiva actividad de la célula  $\beta$  debido a un peso elevado durante el primer año de vida, está



asociada a un incremento del riesgo de padecer DMT1 [109]. A nivel postnatal, es también la hiperactividad del páncreas la que podría inducir el ataque autoinmune. Se ha visto que familiares de pacientes con DMT1 tienen importantes niveles de proinsulina-péptido C conectados en la sangre. En condiciones normales estos niveles son muy bajos, y sólo cuando existe una estimulación sostenida del páncreas, la célula  $\beta$  no tiene tiempo a procesar la insulina correctamente y la secreta de forma inactiva como proinsulina. Pacientes prediabéticos también presentan elevadas tasas de proinsulina:insulina en sangre [109].

Por tanto, en conjunto, podemos suponer que las células  $\beta$  productoras de insulina no son víctimas inocentes del ataque autoinmune, sino participantes activos en el proceso patogénico.

La secuencia exacta de la enfermedad es poco conocida y está poco estudiada en humanos, debido a la rápida progresión de la enfermedad y a la dificultad de estudio del desarrollo del páncreas.

Actualmente, se acepta el modelo de destrucción selectiva de la célula  $\beta$  en la DMT1 propuesto por el Modelo de Copenhague [110]. Este modelo, sugerido por Nerup y colaboradores en 1988 [110] y revisado en 1994 [107] y 2003 [102]. El modelo postula que algún fenómeno del ambiente interno o externo destruiría la célula  $\beta$ , conduciendo a la liberación de proteínas de la célula  $\beta$ . Estas proteínas serían reconocidas por células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, etc.) en los islotes, procesadas como péptidos antigénicos y presentados por el MHC-II. Esto activaría las APCs que producirían y secretarían IL-1, TNF y señales co-estimulatorias. Los linfocitos T que reconocieran dichos péptidos antigénicos procedentes de los islotes pancreáticos desencadenarían una respuesta inmunitaria hacia dichos islotes.

Actualmente, existe una corriente de opinión que sugiere que la diabetes sería el resultado de una serie de cambios menores en la expresión de las proteínas que colectivamente alteran la estabilidad y favorecen la destrucción de la célula  $\beta$  pancreática. En otras palabras, la DMT1 sería una enfermedad multifactorial muy compleja y podría ser vista como una serie de cambios dinámicos que involucran tanto a mecanismos protectores como mecanismos destructores, debido a la interconexión de distintas vías. A este concepto se le ha llamado teoría modular y propondría que la DMT1 está fundamentada sobre una serie de módulos que se definen como distintos fenotipos controlados clínica y patológicamente. Estos módulos pueden interactuar

aditivamente, sinérgicamente o antagonísticamente en cada individuo y condicionar el desarrollo de la enfermedad [111].

#### **4.1 Modelos animales de DMT1. Non-Obese Diabetic mouse (NOD).**

Idealmente, las investigaciones realizadas sobre enfermedades humanas como la DMT1 deberían realizarse directamente con sujetos humanos. Éticamente y funcionalmente esto no es siempre posible, y se han buscado aproximaciones experimentales alternativas como el uso de líneas celulares derivadas de las células  $\beta$  y modelos animales de DMT1. Los modelos animales de desarrollo de la DMT1 de forma espontánea son una herramienta muy útil para el estudio de esta enfermedad y proporcionan datos de gran relevancia. A pesar de esto, hay que tener en cuenta la elevada consanguinidad en los estudios que implican modelos animales experimentales, que si bien, por una parte, favorecen el estudio debido a la existencia de menos variables, limitan, por otra parte, la aplicación de sus resultados en humanos, dada la heterogeneidad genética de nuestra especie en general y de la enfermedad DMT1 en particular. Por tanto, las observaciones hechas en estos modelos pueden representar solamente un subgrupo de la población y deben considerarse con cautela.

En el marco de los modelos animales, existen concretamente dos modelos que desarrollan DMT1 de forma espontánea: El ratón NOD (non-obese diabetic mouse) [112] y la rata BB-DP (biobreeding Diabetes Prone) [113]. Ambos presentan DMT1 espontáneamente y de forma similar a la desarrollada por los humanos.

Concretamente, durante la mayor parte del desarrollo de esta tesis, se ha utilizado el modelo de ratón NOD.

El modelo de ratón NOD es un modelo murino de diabetes autoinmune espontánea. El ratón NOD surgió de un programa de cría para establecer una sublínea susceptible a padecer cataratas llamada CTS (cataract Shionogi). A la 6ª generación de distintas líneas una de ellas, que no manifestaba cataratas, se separó. A la 26ª generación de cruzamiento endogámico, esa línea mostró una importante incidencia de diabetes [114].

El modelo NOD permite estudiar la enfermedad antes de que se manifieste, desde la predicibilidad relativa de la aparición de la misma. Al igual que sucede con los humanos, este modelo está muy influenciado por los factores genéticos y ambientales, sin embargo, a diferencia de los humanos, existe una diferencia de género. Las hembras presentan una incidencia acumulativa de diabetes del 60-90% a las 30

semanas, muy superior al 10-40% que tienen los machos a la misma edad [115] (tabla I.2).

Similitudes	Humanos	Ratones NOD
Predisposición genética y rasgos poligénicos	Sí	Sí
Contribución del loci MHC	Múltiple	Múltiple
Influencia ambiental	Sí	Sí
Defectos en la regulación inmune periférica	Sí	Sí
Alteración de la maduración y de la función de las DC	Posible	Sí
Transmisión de la enfermedad por trasplante de médula ósea	Sí	Sí
Autoantígenos	GAD65, insulina, IA2	GAD65, insulina, IA2
Autoantígeno iniciador	Desconocido	Desconocido
Retraso del debut mediante inmunosupresión	Sí	Sí
Autoinmunidad ligada a la exposición temprana al gluten	Sí	Sí
<b>Diferencias</b>		
Inducción de insulinitis por las células T	Suave	Severa
Gen de la insulina	Uno	Dos
Incidencia	0,25-0,40%	>80%
Incidencia en individuos predispuestos genéticamente	5-30%	>80%
Diferencias de género	No	Sí
Periinsulinitis	No	Si
Infiltrados linfocíticos en otros tejidos	Una minoría	Todos
Requerimiento de células B	No	Sí

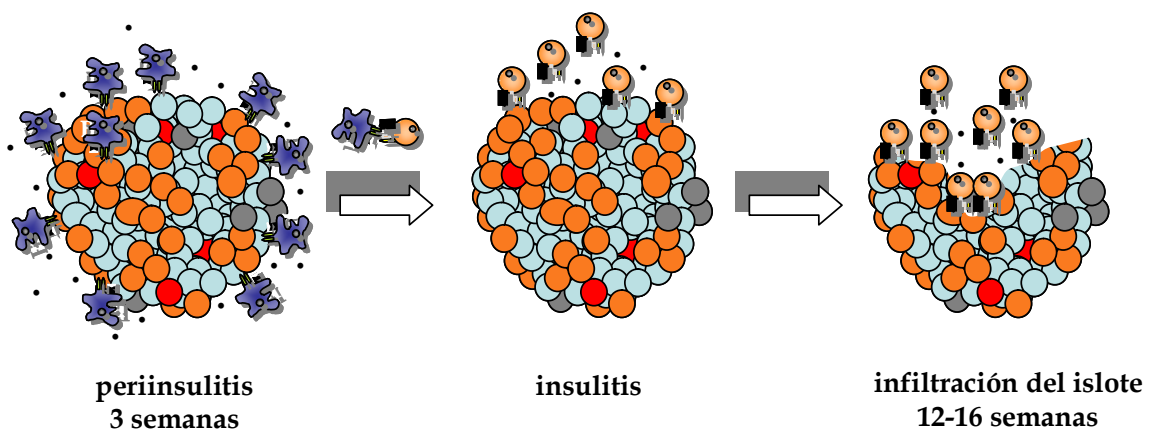
**Tabla I.2.**Comparativa de las características de la DMT1 en humanos y en la cepa NOD (adaptado de [116]).

#### 4.1.1 Patogénesis de la DMT1 en la cepa NOD

La patogénesis de la DMT1 en el ratón NOD es iniciada por macrófagos, células dendríticas y linfocitos CD8 al infiltrar, en primer lugar, la región periductal y

periislote (periinsulitis) alrededor de las 3 semanas de edad. Posteriormente son los linfocitos T CD4 y CD8 los que invaden los islotes pancreáticos causando insulinitis. Esta etapa es seguida por una lenta, progresiva y selectiva destrucción de las células  $\beta$  del islote pancreático, con la consiguiente glicosuria y manifestación clínica de la enfermedad alrededor de las 12-16 semanas [112] (Figura I.18). Del mismo modo que en los humanos, los ratones NOD también presentan los rasgos clásicos de un enfermo diabético: hiperglicemia, hipercolesterolemia, polidipsia, poliuria, cetonuria, polifagia y glicosuria [115].

Las células T CD4+ y CD8+ son las mediadoras de la enfermedad, aunque los linfocitos B también parece ser que tienen cierta relevancia en el desarrollo de la enfermedad (Figura I.18). Los linfocitos CD4+ transferidos a ratones NOD irradiados o a ratones NOD/SCID (deficientes en linfocitos) causan el desarrollo de la enfermedad en los animales receptores [117].

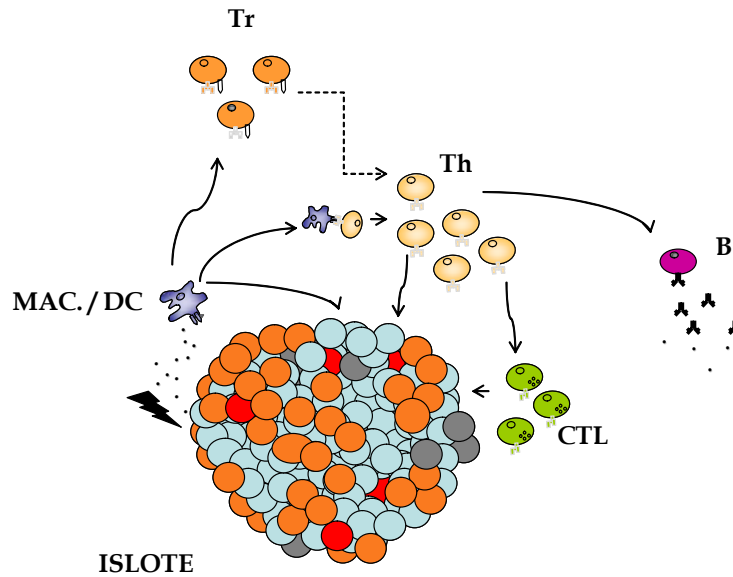


**Figura I.18.** Patogénesis de la célula  $\beta$ .

Los linfocitos T CD4+ son la población predominante en el infiltrado de los islotes pancreáticos y son críticos en el inicio y durante el desarrollo de la enfermedad. La activación células T sería a su vez dependiente de la afluencia de macrófagos en la lesión inflamatoria [115].

Los linfocitos T CD8+ son también importantes para el desarrollo de la enfermedad. Las células T CD8 reconocen los antígenos de la célula  $\beta$  presentados por moléculas de MHC-I presentes en las células  $\beta$  pancreáticas. Los ratones con los linfocitos T deplecionados, tanto genéticamente [118, 119] como con tratamiento con anticuerpos [120], son resistentes al desarrollo de la enfermedad.

El papel de los linfocitos B en la patogénesis de la célula  $\beta$  es un poco controvertido. En general se considera que no son tan necesarios como los linfocitos T y se cree que su principal función durante el desarrollo de la enfermedad es la presentación antigénica, más que la producción de autoanticuerpos. Por tanto, el papel de los linfocitos B se considera secundario [115]. Sin embargo, los ratones NOD deficientes en linfocitos B ( $Ig\mu^{null}$ ) [121] y los ratones NOD tratados con anti- $Ig\mu$  [122] no desarrollan ni insulinitis ni DMT1.



**Figura I.19.** Por distintos motivos (toxinas, estrés local...) proteínas de la célula  $\beta$  (insulina, GAD) quedan expuestas a las APCs (macrófagos o DC) que las presentan a los linfocitos T, a la vez que secretan citoquinas tóxicas para la célula  $\beta$  (IL-1, TNF- $\alpha$ ). Los linfocitos T se expanden, activan a los linfocitos B (producen anticuerpos y presentan antígenos) y a las células citotóxicas (CTL) mediante la secreción de IL-2 y IFN- $\gamma$ . Las CTLs generan citoquinas que destruyen la célula  $\beta$ . A su vez, las APCs estimulan también la generación de células reguladoras (Tr) que intentan suprimir el ataque autoinmune. (Adaptado de [123]).

#### 4.1.2 Influencia de factores genéticos y ambientales en el desarrollo de DMT1 en la cepa NOD

La DMT1 es una enfermedad poligénica. El ratón NOD tiene un haplotipo fijo. Los ratones NOD son homocigotos para el haplotipo H-2<sup>g7</sup> ( $K^d$ , I-A<sup>g7</sup>, I-E<sup>null</sup>, D<sup>b</sup>), que codifica al heterodímero I-A $\alpha^d$  / I-A $\beta^g7$ . I-A<sup>g7</sup> tiene una prolina y una serina en posición 56 y 57 respectivamente, en lugar de la histidina y el aspártico que se hallan en la mayoría de cadenas I-A $\beta$  murinas de cepas no predispuestas a la autoinmunidad [101]. Este haplotipo del MHC-II es esencial para el desarrollo de la DMT1, pero no es

suficiente puesto que se requieren otros componentes genéticos para el desarrollo de la enfermedad, tal y como muestran los estudios en ratones NOR [124].

Los Idds (insulin dependent susceptibility loci) son los loci que confieren susceptibilidad a la enfermedad. Se conocen más de 20 loci distintos. El más importante es el Idd1, que codifica para el MHC [125].

La incidencia de diabetes difiere bastante entre las distintas colonias NOD estabuladas en diferentes animalarios, aún existiendo alta singenia entre ellos. Este hecho resalta la importancia del componente ambiental [115]. La exposición a agentes víricos disminuye la incidencia de diabetes en la cepa NOD. También la dieta tiene un importante efecto en la incidencia de DMT1. La ausencia de patógenos aumenta la incidencia de DMT1 considerablemente en la cepa NOD, lo cual induce a pensar que la presencia de patógenos desencadenaría una respuesta inmunológica general que prevendría de la autoinmunidad, quizás por aumento de los niveles de citoquinas [126]. Paradójicamente, existe la hipótesis que defiende la infección vírica como desencadenante de la DMT1 por mimetización molecular, es decir, ciertas proteínas virales tendrían gran homología a nivel de estructura de 3D con ciertos autoantígenos. Esta homología confundiría al sistema inmunitario que acabaría por reconocer a los autoantígenos como cuerpos extraños [127].

#### **4.1.3 Defecto inmunitario en el desarrollo de la DMT1 en la cepa NOD**

La predisposición a la autoinmunidad en la cepa NOD es debida tanto a defectos en la tolerancia central como en la periférica [101].

Los defectos en la tolerancia central se atribuyen a una deficiente selección negativa mediada por el haplotipo singular que el MHC-II de los ratones NOD presenta, MHC-II (I-A<sup>g7</sup>) y también a un defecto intrínseco de la señalización de la célula T. Además, I-A<sup>g7</sup> se une con baja afinidad a muchos péptidos favoreciendo una presentación pobre de los mismos a las células T que los reconocen, escapando en última instancia de la selección negativa del timo a la periferia [128]. Cabe añadir que la habilidad del MHC-II I-A<sup>g7</sup> para estimular linfocitos T es baja [129]. Esta alteración en la selección negativa defectuosa en el timo que ocurre en el ratón NOD, contribuye al aumento de células T autoreactivas en la periferia.

Respecto a la tolerancia periférica, el modelo NOD presenta alteraciones en la señalización de la activación y la apoptosis de la célula T. Además, la co-estimulación defectuosa por las células accesorias y junto con las anomalías existentes en el

comportamiento de las células reguladoras, promueven la activación de las células T autoreactivas existentes. Los linfocitos T CD4 están polarizados hacia el fenotipo Th1, y son resistentes a la muerte celular inducida por activación (AICD: Activation Induced Cell Death) [130-132].

Las APCs tienen una función coestimuladora que en el caso de la cepa NOD está alterada. Las células dendríticas (DC) y macrófagos provenientes de la cepa NOD tienen niveles basales de CD86 (B7) inferiores a otras cepas murinas. Después de una activación con anti-CD3 la inducción de CTLA-4 y CD86 sigue siendo inferior a la alcanzada por otras cepas murinas [133]. Los animales NOD deficientes en CD28 o B7 son más susceptibles a padecer diabetes [134].

A nivel regulatorio existe también un importante defecto. Un trabajo reciente sugiere que la evolución de la enfermedad es debida a una disminución de la actividad de las células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, a medida que aumenta la edad del ratón. Por otro lado, las células diabetogénicas serían más resistentes al TGF- $\beta$  condicionando el aumento de la respuesta autoinmune [135]. En relación con esta hipótesis se ha descrito que los tratamientos que disminuyen la incidencia de diabetes se han asociado a un aumento en la frecuencia de células reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> [134].

Los niveles de células Natural Killer (NK) de la cepa NOD en el bazo, timo como en el hígado son inferiores comparado con los niveles de una cepa no autoinmune. Esta disminución en el número de NKs probablemente viene condicionado por una disminución en los precursores de células T [136].

#### **4.1.4 Defectos en la célula $\beta$ que condicionan el desarrollo de la DMT1 en la cepa NOD**

Se ha descrito una hiperinsulinemia transitoria en la cepa NOD en comparación con la cepa NOD/SCID y con otras cepas control, que se correspondería con un aumento de la actividad de la célula  $\beta$  [137, 138]. Esta hiperactividad de la célula  $\beta$  se desarrolla entre las 2 y las 4 semanas de edad, coincidiendo con el cambio de dieta por el paso de la leche materna a pienso. La leche materna contiene muy poca glucosa, por lo que las células  $\beta$  se mantienen en relativo reposo. Con el cambio a una dieta con un aumento significativo de la glucosa, se estimularían las células  $\beta$  [139]. Esta hiperactividad de las células  $\beta$  produciría un incremento de los niveles de autoantígenos que las haría más sensibles al ataque autoinmune [140].

A las 8 semanas de edad, la insulinemia basal de los ratones NOD sigue siendo más alta que en el resto de cepas control, sin embargo la secreción de insulina por unidad de célula  $\beta$  no es superior a la secreción del ratón NOD/SCID [138, 141].

La formación de neo-epítomos es otra de las posibles causas de la DMT1. Existen diferentes mecanismos propuestos para explicar su generación. El aumento de los niveles de proinsulina en sangre debido a la hiperactividad de la célula  $\beta$ , dejaría expuestos ciertos epítomos que normalmente no se observarían, como los que se encuentran en los puntos de corte para la generación de la insulina. La eliminación de las células T reactivas específicas para la proinsulina por expresión transgénica del MHC-II de la proinsulina previene la aparición de diabetes [142]. Existe también una proteasa, la Granzyme B, liberada por los gránulos citosólicos de las células T CD8, que generarían con su actividad proteolítica nuevos epítomos potenciales nunca expuestos anteriormente al sistema inmune y que podrían desencadenar una respuesta autoinmune [143, 144].

La apoptosis también se ha definido como una posible causa de la inducción del ataque autoinmune hacia la célula  $\beta$ . Aunque tradicionalmente la apoptosis (muerte celular programada del organismo) se describió como un proceso no inflamatorio, son abundantes los estudios que le atribuyen un marcado efecto inductor de respuesta inmune [145-149]. Se ha descrito que los ratones neonatos presentan un marcado incremento en la apoptosis pancreática alrededor de los 21 días después de su nacimiento [150] y que esta apoptosis es superior en el caso del ratón NOD [151]. Este hecho coincide con la aparición por primera vez de la respuesta autoinmunitaria en el ratón NOD a los 21 días. Por tanto, este aumento neonatal de los niveles de apoptosis podría iniciar el proceso autoinmunitario pancreático, proporcionando ciertos autoantígenos para ser presentados al sistema inmune en individuos genéticamente predispuestos [151].

#### **4.1.5 Autoantígenos de la DMT1 en la cepa NOD**

El suero de los pacientes con DMT1 presenta autoanticuerpos contra varios antígenos expresados en el islote: insulina, ácido glutámico descarboxilasa 65 (GAD 65), IA-2, tirosina fosfatasa deshidrogenasa, etc. Sin embargo, el papel directo de estos autoanticuerpos en la patogénesis de la DMT1 permanece incierta [112].

Se ha descrito la existencia de células T que responden al estímulo de la insulina [152] y GAD65 a las 3-4 semanas de edad del ratón NOD. La inducción de tolerancia



neonatal hacia GAD65 elimina la aparición de insulitis y DMT1 [153-155]. El tratamiento con insulina o con la cadena  $\beta$  de la insulina [156], la proinsulina [157] o el péptido p277 de hsp60 [158, 159] previene la aparición de la DMT1 y disminuye la respuesta hacia los otros autoantígenos. Se han descrito unos 10 autoantígenos de la DMT1 en el ratón NOD, de todos ellos, sólo la insulina es específica de la célula  $\beta$ .

Aunque no se conoce con certeza el antígeno esencial para desencadenar la respuesta autoinmune, ciertas publicaciones recientes apuntan a la insulina como el autoantígeno clave en el desarrollo de esta enfermedad. Se ha generado un modelo NOD doble genoanulado para la proinsulina 1 y 2 y transgénico a la vez para una proinsulina funcional mutada no inmunogénica (Tyr posición 16 por Ala). Este modelo no desarrolla ni insulitis, ni autoanticuerpos para insulina, ni DMT1 [160]. Paralelamente, un estudio realizado en humanos donde se aíslan y clonan células T de nódulos linfáticos pancreáticos de pacientes diabéticos con el alelo MHC DR4 (un alelo de susceptibilidad en la diabetes de tipo 1) muestra que la gran mayoría de clones de células T autoreactivas reconocen el epítipo A 1-15 de la insulina, restringido a DR4 [161]. Además, el reconocimiento de este epítipo por las células T viene inducido por una modificación post-traducciona que introduce un puente disulfuro entre los aminoácidos A6 y A7 de la insulina. Este epítipo se aisló de un paciente con autoanticuerpos para insulina, sin embargo no se consiguió aislar dicho epítipo de personas sanas, incluso teniendo el mismo HLA (DR4+) [162].

### **4.1.5.1 Autoantígenos de origen neuroendocrino. La proteína GFAP**

El desencadenante inicial de la respuesta autoinmune, o dicho de otro modo, la proteína responsable de la primera respuesta autoinmune, es una incógnita. Existe la hipótesis que postula que no serían los antígenos de las células  $\beta$  los desencadenantes iniciales de esta respuesta autoinmune, sino que serían las proteínas periislole de origen neuroendocrino las primeras en desencadenar el ataque autoinmune [163]. Esta afirmación viene apoyada por varias observaciones experimentales.

En primer lugar, los modelos animales con predisposición a padecer DMT1, como es el modelo NOD, muestran además susceptibilidad a desarrollar autoreactividad hacia tejidos neuronales [164, 165]. En segundo lugar, los islotes están rodeados de fibras nerviosas y de un tipo de células de Schwann que expresan GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein) y S100 $\beta$  [166]. Cuando las células T inicialmente invaden el islote, no se mueven directamente hacia la célula  $\beta$  en el interior del islote, sino que permanece

alrededor de las células de Schwann, esto ocasiona una pérdida gradual de la tinción inmunohistoquímica para GFAP, antes incluso de observarse la disminución en la tinción para insulina [166, 167]. Recientemente Carrillo et al [168] han observado que la mayoría de células B aisladas del infiltrado pancreático de ratones NOD producen anticuerpos contra proteínas del sistema nervioso pancreático (periferina, GFAP, GAD65 y GAD67). Estos datos sugieren que las células de Schwann serían la causa inicial de la DMT1. Finalmente, se han detectado células T autoreactivas contra GFAP en NOD. También existen autoanticuerpos de GFAP en el modelo NOD. Además, pacientes con DMT1 o individuos prediabéticos muestran respuesta proliferativa hacia GFAP o hacia S100 $\beta$ . También se detectan autoanticuerpos contra GFAP en dichos pacientes [169].

Sin embargo, estas proteínas de origen neuroendocrino no son esenciales para el desarrollo de la enfermedad, si bien pueden formar parte en el inicio de la misma, ya que clones específicos de antígenos de la célula  $\beta$  son capaces de mediar la respuesta autoinmune cuando son transferidos a ratones NOD/SCID [170]. La generación de células T reactivas para GFAP transferidas a ratones NOD/SCID no provocan la aparición de DMT1, sólo una ligera periinsulitis que no evoluciona hacia una destrucción de la célula  $\beta$ . Sin embargo, la inmunización con anticuerpo anti-GFAP o anti-S100 $\beta$  puede inhibir la transferencia de DMT1 [169].

#### **4.2 Variaciones en la masa de célula $\beta$ en el ratón NOD, previas al desarrollo de la enfermedad**

La masa de células  $\beta$  en el páncreas de los ratones NOD de 8 semanas de edad es un 69% la de los ratones BALB/C, sin embargo la tasa de proliferación medida por la incorporación de Brdu es superior en los ratones NOD. Esto sugiere que existe una actividad compensatoria de la destrucción autoinmune de la célula  $\beta$ , mediante un aumento de la proliferación. Sin embargo, esta compensación no es suficiente y la masa de células  $\beta$  en ratones NOD diabéticos disminuye gradualmente, llegando a ser un 73% inferior a la de los ratones BALB/C a las 18 semanas de edad. Además de la reducción en la masa  $\beta$  pancreática, existe una reducción adicional de la funcionalidad, observándose también una disminución de la secreción de insulina. La diabetes no se manifiesta abiertamente hasta que la masa de célula  $\beta$  no es inferior al 30% la de un ratón control, manteniéndose los niveles de normoglicemia hasta ese momento [141].