

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



IV.-RESULTADOS Y CONCLUSIONES

10 Resultados (Objetivo I)

La mutación R24C en la Cdk4 resulta en la hiperactividad de dicha molécula. Teniendo en cuenta los resultados previos publicados por Rane et al. [42] sobre el modelo genomodificado Cdk4R24C donde se mostraba una hiperplasia de la célula β pancreática, nuestro primer objetivo se centró en estudiar si el efecto en la célula β pancreática causado por la mutación R24C en la molécula Cdk4 podría alterar la fisiología de la célula β .

Todos los ensayos se realizaron en animales de 2 meses de edad de ambos sexos.

10.1 Morfología del islote

Se realizaron análisis morfométricos del área β -celular de los islotes pancreáticos de los ratones Cdk4R24C en comparación con los WT pertenecientes a la misma camada.

Cortes de páncreas enteros de animales de 2 meses de edad fueron inmunoteñidos para insulina (Figura IV.1).

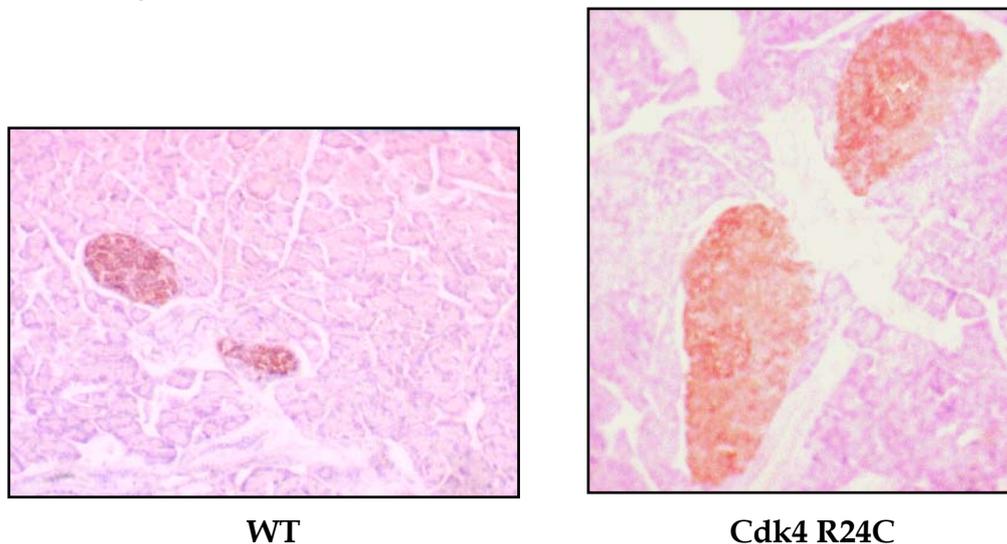


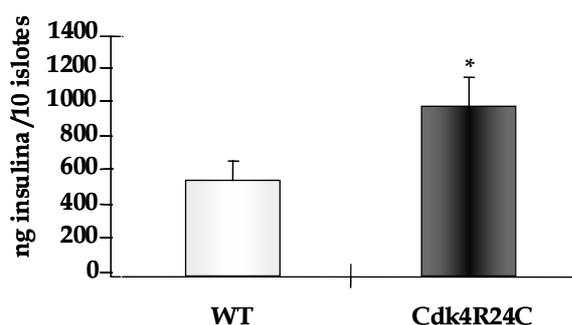
Figura IV.1. Inmunotinción con insulina. Fueron analizados 180 islotes de 6 animales distintos de cada genotipo.

Los animales Cdk4R24C muestran un área β celular por islote de $47200 \pm 9135 \mu\text{m}^2$ mientras que el área β celular por islote de los animales WT es inferior, $24800 \pm 2356 \mu\text{m}^2$. Por lo tanto, los animales Cdk4R24C muestran un área β -celular por islote 2 veces superior a la de los animales WT.

10.2 Contenido de insulina

En islotes aislados de páncreas de animales Cdk4R24C y WT de dos meses de edad se realizó un análisis del contenido de insulina por islote. Los islotes de los animales Cdk4R24C contienen 990 ng insulina/10 islotes, mientras que el contenido de insulina de los islotes de los animales WT es de 556 ng insulina/10 islotes (Figura IV.2).

Figura IV.2. Contenido de insulina en 10 islotes. Los datos son resultado de la observación de 6 animales por grupo experimental (30 islotes por animal). * $p < 0,05$. Media \pm SEM



Por tanto, el contenido de insulina por islote de los animales Cdk4R24C es superior al de los animales WT.

10.3 Glicemia e insulinemia

Se midió la glicemia y la insulinemia de los animales de los dos grupos experimentales a los dos meses de edad, después de un periodo de ayunas de 3 horas.

A pesar de la hiperplasia de la masa β celular de los islotes pancreáticos y del elevado contenido de insulina de los islotes de los animales Cdk4R24C, la glicemia e insulinemia se mantienen sin diferencias significativas con respecto a la de los animales WT de su misma edad (Figura. IV.3)

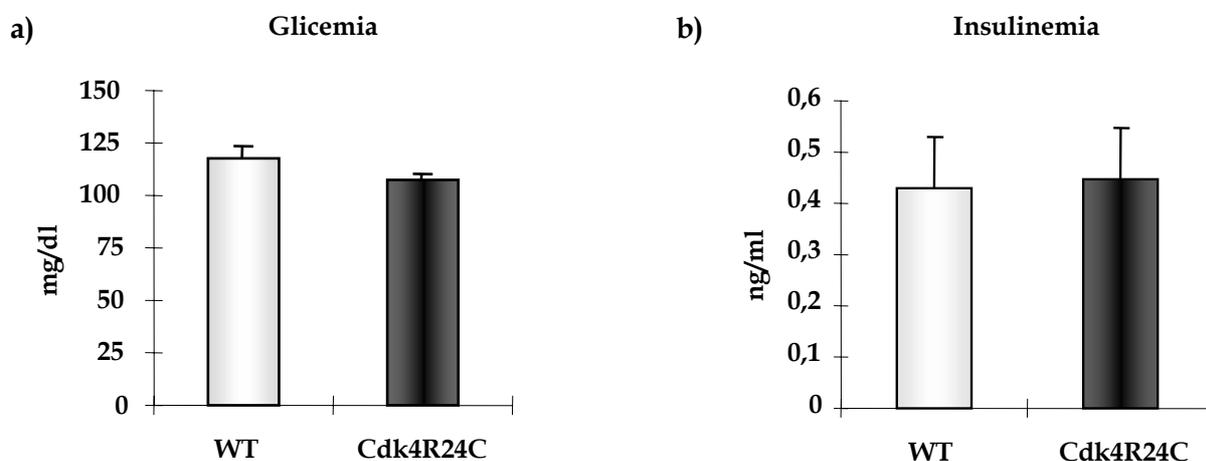


Figura IV.3. Glicemia (a) e insulinemia (b) de los animales WT y Cdk4R24C. (n=7 WT, n=11 Cdk4R24C). Media \pm SEM

10.4 Fisiología del islote

10.5 Conversión de proinsulina a insulina

Como ya se ha comentado, la insulina se sintetiza en forma de proinsulina y mediante una reacción proteolítica se obtiene la molécula de insulina activa (ver apartado 2.1). Para investigar si la insulina se sintetiza y procesa correctamente en los islotes Cdk4R24C se realizaron los ensayos de conversión de proinsulina a insulina.

Mediante un marcaje con ^{35}S -Metionina y una incubación a diferentes tiempos, se analizó la biosíntesis y la conversión de proinsulina a insulina por fluorografía (Figura IV.4).

No se observan diferencias en la conversión de proinsulina a insulina entre los islotes de los animales Cdk4R24C y los animales WT.

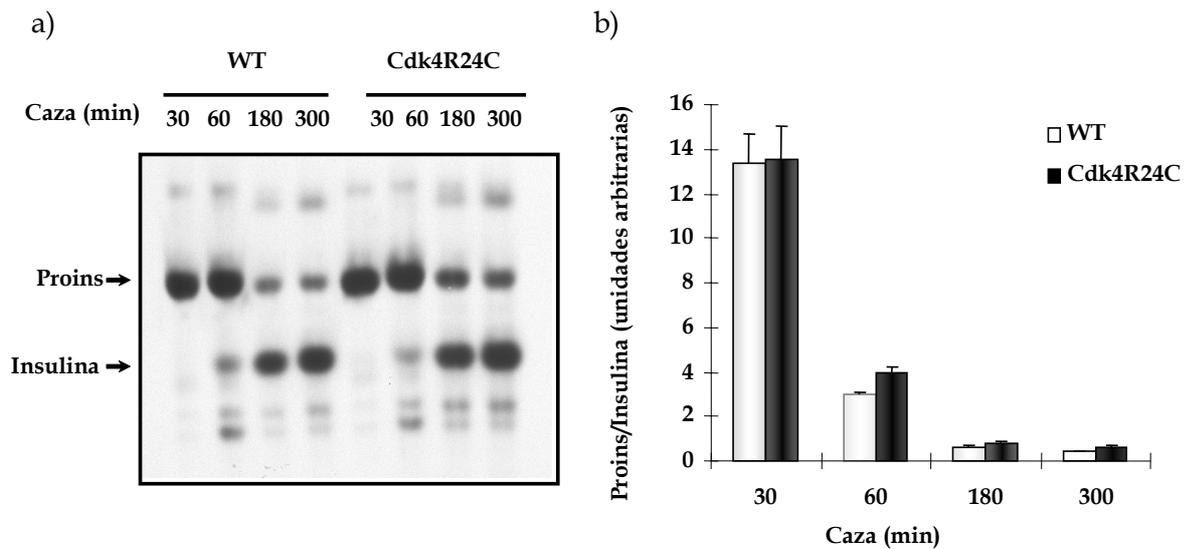


Figura IV.4. Biosíntesis y conversión de proinsulina a insulina. a) Inmunoprecipitados de insulina y proinsulina. b) Cuantificación niveles de proinsulina/insulina a los distintos tiempos. Los valores son resultado de 3 experimentos independientes. Media \pm SEM.

Estos resultados sugieren que la proinsulina producida por los islotes de los ratones Cdk4R24C es procesada correctamente como producto final.

10.6 Oxidación y utilización de glucosa

Finalmente, se procedió a determinar si los islotes de los animales Cdk4R24C tenían un correcto metabolismo de la glucosa.

Se incubaron los islotes con un medio con 5,5 mM o 16,7 mM glucosa marcada radiactivamente con ^3H y ^{14}C y posteriormente se midió el $^3\text{H}_2\text{O}$ (utilización) y el $^{14}\text{CO}_2$ (oxidación) generado durante la incubación.

Los resultados obtenidos sugieren que los islotes de los ratones Cdk4R24C tienen un metabolismo de la glucosa comparable al de los animales WT (Figura IV.5).

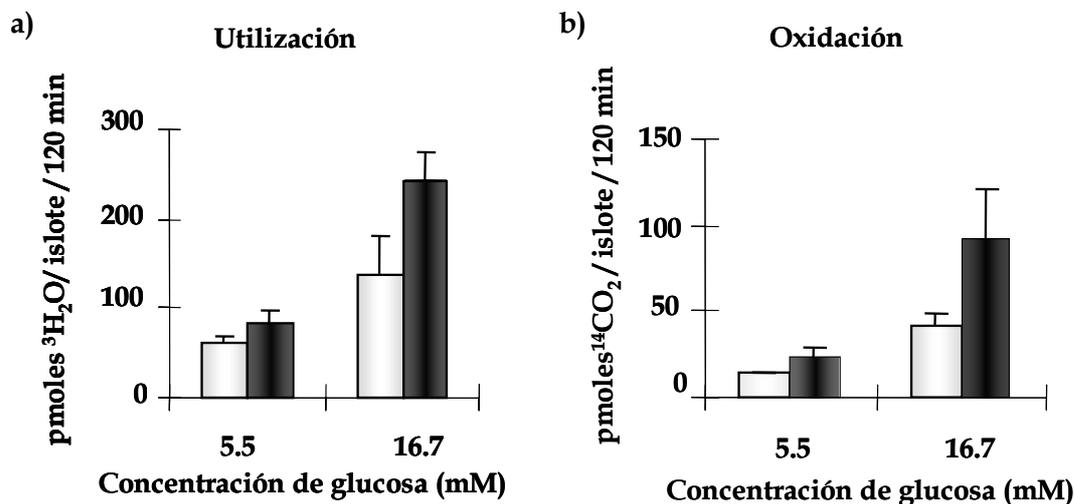


Figura IV.5. Utilización (a) y oxidación (b) de la glucosa. Los resultados corresponden a 8 observaciones de 2 experimentos independientes (a) y a 12 observaciones de 3 experimentos independientes (b). Media \pm SEM. \square WT; \blacksquare Cdk4R24C.

10.7 Secreción de insulina

Para evaluar la correcta fisiología de la secreción de insulina en los islotes Cdk4R24C, se realizó una perfusión de los islotes pancreáticos. A diferencia de una secreción estática (con un único tiempo de recogida del medio de secreción), la perfusión nos da una idea más real de lo que está sucediendo in vivo en la célula β , ya que los islotes aislados se ven sometidos a un flujo de medio continuo donde a diferentes tiempos van cambiando las concentraciones de glucosa, de un modo similar a lo que podría ocurrir en el islote in vivo. El hecho de trabajar con islotes aislados permite centrarnos exclusivamente en el comportamiento del islote y discriminar la posible intervención de otros órganos en el aclarado de los niveles de insulina y de glucosa en sangre.

Cuando se estimulan los islotes con 16,7 mM glucosa a los 16 min, se observa un pico de secreción de insulina alrededor de los 32 min, a partir de ese momento el patrón de secreción toma dos rumbos distintos en función del modelo experimental (Figura IV.6), mientras en los animales WT la secreción se estabiliza y va disminuyendo cuando se cambia a una concentración de glucosa 2,8 mM, llegando a los niveles basales iniciales a los 55 min, en el caso de los animales Cdk4R24C la secreción sigue aumentando considerablemente, hasta el punto de cambio de la concentración de glucosa a los 42 min, entonces la secreción de insulina se estabiliza y no es hasta alrededor de los 55 min que se empieza a observar un ligero descenso en la secreción de insulina.

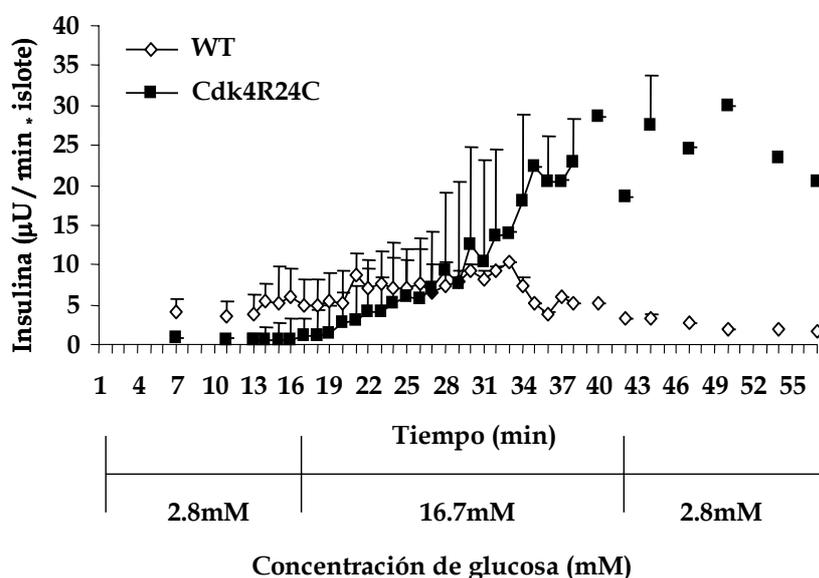


Figura IV.6. Secreción de insulina de los islotes pancreáticos perifundidos. Los resultados corresponden a 6 observaciones procedentes de 2 experimentos independientes. Media \pm SEM.

Por tanto, los ratones Cdk4R24C inicialmente responden normalmente a un estímulo de glucosa, pero presentan una mayor amplitud y altura del pico de secreción de glucosa y un retraso en el retorno a los niveles basales.

10.8 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa

Para determinar el comportamiento in vivo de la célula β en los ratones Cdk4R24C, se inyectó intraperitonealmente una carga concreta de glucosa a los ratones y posteriormente se hicieron medidas de la glicemia y de la insulinemia a distintos tiempos.

Como muestra la figura IV.7, el pico de glicemia a los 30 minutos en los ratones Cdk4R24C (157 mg/dl) es inferior al pico de glicemia de los animales WT (201 mg/dl). A los 60 minutos post-inyección los ratones Cdk4R24C ya han recuperado la normoglicemia (106 mg/dl), mientras que los animales WT permanecen hiperglicémicos (157 mg/dl), no alcanzando la normoglicemia hasta los 120 minutos. Los resultados de la glicemia concuerdan con lo observado en la medida de las insulinemias. A los 15 minutos, los animales Cdk4R24C presentan un pico de insulinemia (1,77 ng/ml) que explicaría la rápida disminución de los niveles de glicemia y la vuelta a los niveles basales que presentan los animales Cdk4R24C a los 30 y 60 minutos. Cabe destacar también que el pico de insulina de los animales Cdk4R24C además de ser más elevado, se produce incluso antes que el pico de los animales WT, ya que los animales WT no adquieren el pico máximo de secreción hasta los 30 minutos. Aún así, los niveles de insulinemia de los animales WT a los 30 minutos son incluso menores que los niveles de insulinemia de los animales Cdk4R24C a ese mismo tiempo (1,24 y 1,43 ng/ml respectivamente). Esto concordaría con los resultados observados en la secreción de insulina con islotes perifundidos, donde se observa una secreción superior y sostenida durante más tiempo. Sin embargo, con la IPGTT se recuperan los niveles basales de insulinemia al mismo tiempo en los dos grupos (120 min).

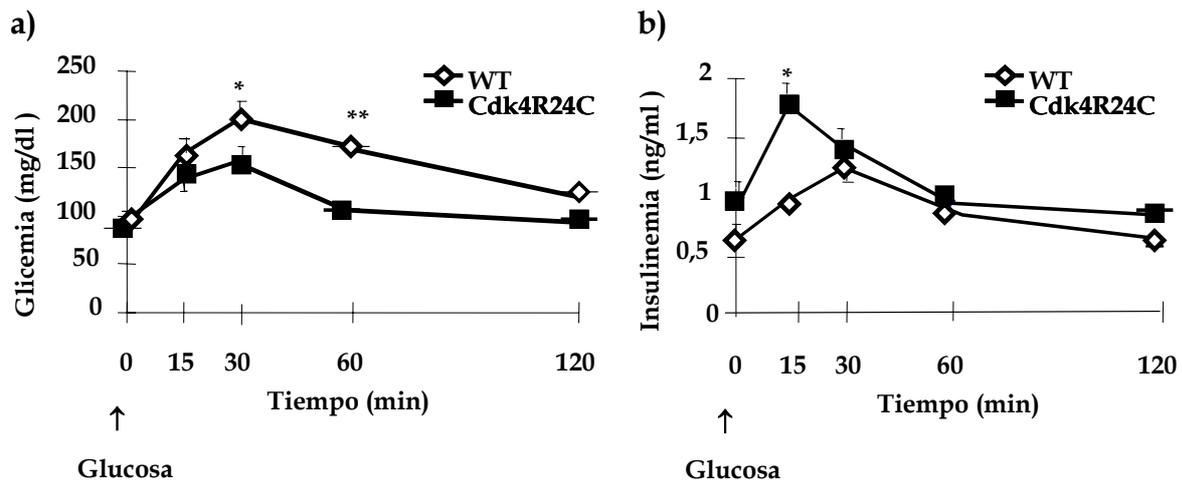


Figura IV.7. Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa. Evolución de la glicemia **(a)** y de la insulinemia **(b)** a distintos tiempos después del estímulo intraperitoneal de glucosa. WT(n=9), Cdk4R24C (n=7). * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. Media \pm SEM.

11 Resultados (Objetivo II)

La limitación más importante en los ensayos de proliferación y reposición es que dependen mucho de la especie. Solamente los ensayos con células β humanas nos pueden ayudar a entender exactamente el ciclo celular de éstas. Es decir, solamente los estudios con islotes humanos pueden determinar si la Cdk4 tiene una función importante en la replicación de la célula β humana, como inducen a pensar los estudios con islotes de roedores.

Viendo el efecto que la Cdk4R24C tiene en la proliferación de islotes de ratón, se planteó la posibilidad de estudiar si este efecto se mantiene en islotes humanos de donantes cadavéricos. Se planteó investigar el efecto de la expresión de la Cdk4R24C en la proliferación de la célula β , en islotes humanos infectados con vectores lentivirales.

Para introducir la mutación Cdk4R24C en los islotes humanos se generaron lentivirus con el cDNA de la Cdk4R24C humana bajo el control del promotor de CMV y se infectaron los islotes humanos frescos.

11.1 Proliferación de los islotes humanos con la mutación Cdk4R24C

En primer lugar se quiso comprobar si la Cdk4R24C inducía la proliferación de los islotes humanos.

Se infectaron los islotes con la forma mutada de la Cdk4 o LacZ como control y al cabo de tres días se incubaron con timidina tritiada para analizar su incorporación en los islotes humanos y por tanto su proliferación (Figura IV.8).

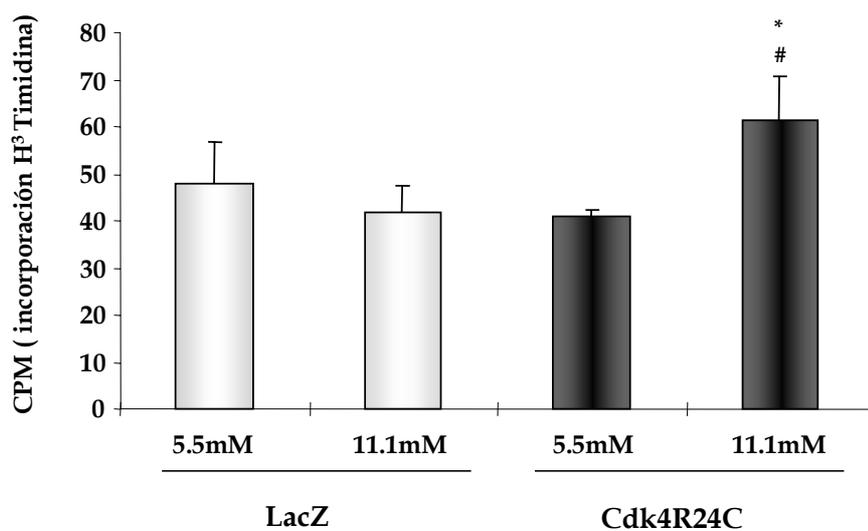


Figura IV.8. Proliferación de los islotes humanos infectados con LacZ (control) o Cdk4R24C. Los resultados están normalizados por islote y se expresan como media \pm SD. * $p < 0,05$ (LacZ 11,1mM

glucosa respecto Cdk4R24C 11,1 mM glucosa); #p<0,05 (Cdk4R24C 5,5 mM glucosa respecto Cdk4R24C a 11,1 mM glucosa). La figura es representativa de tres experimentos distintos.

Se puede observar como los islotes infectados con Cdk4R24C muestran una tasa de proliferación más elevada (61,23 cpm) que los controles infectados con LacZ (41,8 cpm) a 11,1 mM glucosa. El efecto promotor de la proliferación es dependiente de glucosa, ya que como se puede apreciar, la proliferación de los islotes infectados con Cdk4R24C a 11,1 mM glucosa (61,23 cpm) es superior a la de los islotes infectados con Cdk4R24C a 5,5 mM glucosa (40,73 cpm). No se observa variación en los niveles de proliferación a 5,5 mM glucosa entre los islotes infectados con Cdk4R24C y LacZ respectivamente.

11.2 La Cdk4R24C aumenta la proliferación de las células β pancreáticas humanas

En la figura anterior se observa como la Cdk4R24C aumenta la proliferación del islote, sin embargo, se desconoce si la Cdk4R24C influye directamente en la proliferación de la célula β o de otros tipos celulares del islote. Si bien es verdad que la población de células β en los islotes pancreáticos es mayoritaria (80% del total) era necesario verificarlo. Para ello se realizó una infección lentiviral de los islotes pancreáticos con el vector lentiviral Cdk4R24C o con un vector control, posteriormente se disgregaron los islotes y se analizó la proliferación de la célula β por inmunocitoquímica mediante la co-tinción de las células con KI67 (marcador de proliferación) y con insulina (marcador de célula β) (Figura IV.9).

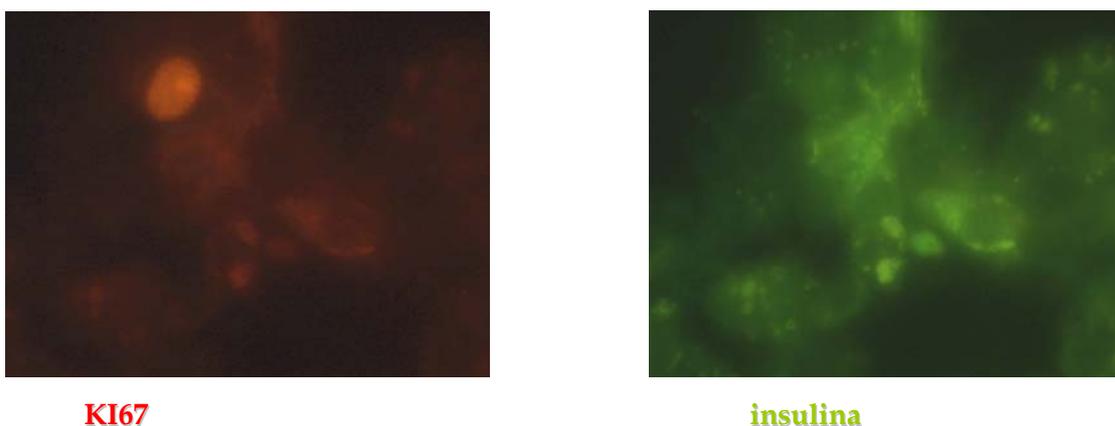


Figura IV.9. Proliferación de las células β de los islotes humanos infectados con el vector control LacZ o el vector Cdk4R24C. Inmunocitoquímica de la células β infectadas con el vector Cdk4R24C, a la izquierda tinción con KI67 (rojo), a la derecha tinción con insulina (verde).

El porcentaje de células β KI67+ y que por tanto están proliferando, es superior en los islotes infectados con el vector lentiviral Cdk4R24C (3,92%) respecto al porcentaje de células β que están proliferando en los islotes infectados con el vector control (LacZ) (0,47%), estas diferencias son significativas siendo la *odds ratio* (OR) = 8,66.

Estos resultados indican que la proliferación que se observaba en el experimento de incorporación de timidina en los islotes totales es debida mayoritariamente a la proliferación de las células β .

11.3 Expresión de niveles de GLUT2 en islotes humanos infectados

Mediante citometría de flujo de los islotes infectados y posteriormente disgregados, analizamos la expresión de la molécula GLUT2 en la superficie de los islotes humanos (Figura IV.10). La molécula GLUT2 es el transportador de glucosa característico de la célula β , su localización en la superficie de la membrana plasmática y su expresión exclusiva en las células β de los islotes pancreáticos, la convierten en una proteína idónea para el estudio de la célula β mediante citometría de flujo.

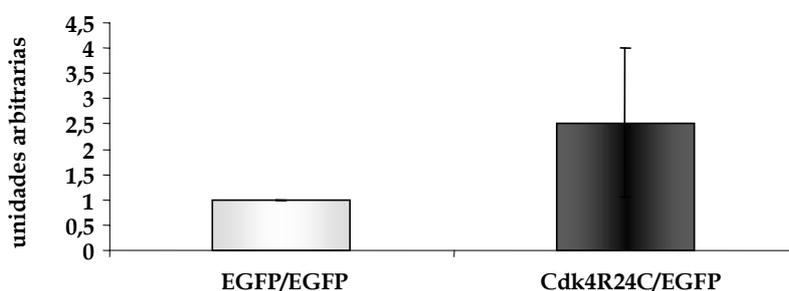


Figura. IV.10. Incremento de expresión de GLUT2 en la superficie de los islotes humanos infectados con Cdk4R24C respecto a los niveles de expresión de Glut2 en los islotes infectados con el vector control EGFP. Media \pm SD. Resultados de 3 observaciones distintas.

Como se observa en la figura IV.10, el número de células GLUT2+ de los islotes humanos infectados con el vector lentiviral Cdk4R24C es superior ($2,5 \pm 1,4$ veces) comparado con el número de células GLUT2+ de los islotes infectados con el vector control EGFP. Estos resultados corroboran que la forma Cdk4R24C aumenta la proliferación de las células β pancreáticas, como refleja el aumento en el número de células GLUT2+.

12 Discusión resultados (Objetivo I y II)

El modelo Cdk4R24C descrito por primera vez por Rane et al [42], donde la mutación R24C impide la unión de la Cdk4 con la familia de inhibidores Ink4, muestra una hiperplasia de la masa de células β pancreáticas debido a la hiperactivación de la Cdk4.

En la presente tesis se ha caracterizado bioquímica y fisiológicamente el fenotipo de los islotes pancreáticos Cdk4R24C en un fondo genético CD1/129Sv, para determinar si la hiperplasia de célula β podría estar alterando de algún modo el comportamiento normal de la célula β y su funcionalidad. Como ya se ha observado, tanto la fisiología (la biosíntesis y la secreción de insulina), como el metabolismo (la oxidación y la utilización de glucosa), no se ven alteradas en los islotes Cdk4R24C hiperplásicos.

Últimamente, la proliferación de la célula β se ha definido como pieza clave en el mantenimiento postnatal de la masa β pancreática. Artículos como el de Dor. et al [88] apoyan fuertemente esta hipótesis. Mediante un sistema de marcación del linaje celular, se pone de manifiesto que el mantenimiento de la masa de células β en ratones no es dependiente de la diferenciación de células madre, sino de la propia replicación de las células β ya existentes. Se ha demostrado que la Cdk4 es esencial para la proliferación de la célula β . El ratón deficiente en Cdk4 [42] desarrolla diabetes mellitus insulino dependiente, ya que no existe ninguna otra Cdk (la Cdk6 no se expresa en islotes [95]) que compense su función en la célula β en su ausencia. La Cdk4 es una proteína que se expresa naturalmente en la célula β , por tanto, éste no es un modelo de expresión ectópica para inducir replicación β celular.

El aumento de la masa de células β depende del número de células que entran en el ciclo celular [176]. Se ha observado que en el modelo genomodificado Cdk4R24C hay un aumento de la replicación de las células β [95], lo que explicaría el aumento de masa de célula β por islote de hasta 2 veces superior que se observa en los animales Cdk4R24C respecto a la población WT y que también comprobaron otros autores [42]. Además, estos islotes Cdk4R24C son funcionales y contienen más insulina que a su vez, es procesada correctamente.

Podría esperarse que una marcada hiperplasia de la masa de células β y con unos niveles de insulina elevados, estos animales presentasen hipoglicemia e hiperinsulinemia, pero sorprendentemente, los niveles de glicemia e insulinemia se mantienen comparables a los del grupo control. También observado por Rane et al [42].

El modelo genomodificado Cdk4R24C tiene un control estricto de la glicemia, como lo demuestran los datos de la IPGTT, donde se observa que el pico de secreción de insulina es superior en los animales Cdk4R24C, comparado con los WT, que se materializa en un aumento inferior de la glicemia después de la inyección de una dosis de glucosa y de una recuperación más rápida de los niveles basales de glicemia, sin alcanzar en ningún caso la hipoglicemia.

Los estudios de perfusión *in vitro*, muestran un incremento en la secreción de insulina después de un estímulo con una concentración elevada de glucosa y un retraso en la recuperación de los niveles basales después del retorno a una concentración baja de glucosa. A pesar de ello, y como ya se ha indicado, los niveles de glicemia e insulinemia se mantienen constantes. Este hecho sugiere que probablemente los órganos encargados del aclaramiento de la insulina tengan un papel en esta apreciación. Esta observación, junto con la gran cantidad de tumores endocrinos pancreáticos que presenta este animal a edades avanzadas [53] (el 32% de los animales presentan este tipo de tumores al morir), podría inducir a pensar que el efecto observado en el experimento de perfusión es debido a un comportamiento tumoral del islote. De todos modos, el modelo Cdk4R24C no presenta tampoco hipoglicemia ni hiperinsulinemia a edades avanzadas (12 meses) (datos cedidos por la Dra. Ortega y el Dr. Barbacid). Es posible, por tanto, que los experimentos de perfusión *ex vivo*, no reflejen completamente el escenario *in vivo*, donde la insulina es metabolizada en varios tejidos, especialmente en el hígado, manteniendo la homeostasis de la glucosa.

Existen datos adicionales que corroboran las observaciones descritas en este trabajo. En primer lugar, Hino et al [177] generaron animales transgénicos que expresaban la Cdk4R24C bajo el promotor de la insulina (Tg HIP-Cdk4R24C). En este modelo se obtuvo una expresión específica de célula β en un fondo genético C57BL/6 y DBA2. Cabe recordar que, en la presente tesis, la Cdk4R24C se expresa de forma ubicua en todas las células del organismo y en el fondo genético mixto CD1 x 129. El modelo Tg HIP-Cdk4R24C presenta hiperplasia de la célula β , la tolerancia a la glucosa y la secreción de insulina es superior, del mismo modo que ocurre en el modelo genomodificado Cdk4R24C. No se observa tampoco hipoglicemia en ningún caso. Cabe destacar que el modelo Tg HIP-Cdk4R24C no presenta insulinomas a los 18 meses de edad y no hay diferencias significativas en la actividad de la telomerasa. Los niveles de expresión de Glut2 (marcador de células β muy diferenciadas) son similares en los dos grupos experimentales y no se observa expresión de Pax4 (expresado en células β poco diferenciadas), ni de Glut1 (expresado específicamente en células transformadas en insulinoma como la línea celular MIN6) en los islotes de los animales Tg HIP-Cdk4R24C

[177]. Por tanto, todo indicaría que a pesar de la sobreexpresión de la forma Cdk4R24C en los islotes pancreáticos, éstos no adquieren un fenotipo maligno. Además existe un mecanismo intrínseco de la célula β para protegerla de un estímulo mitótico que no procede. La célula β es capaz de inducir la apoptosis de las células malignas como mecanismo de defensa, como sucede en el modelo Tg de sobreexpresión del protooncogén c-Myc en la células β , que causa una hiperplasia inicial de la célula β seguida de apoptosis, disminución de la masa β celular y diabetes [178], mecanismo que no se observa en el modelo genomodificado Cdk4R24C. Este argumento se vuelve más relevante, si pensamos además que la tasa de apoptosis en el modelo Cdk4R24C es igual a la del grupo control [95]. Estudios en animales transgénicos que sobreexpresan la Cdk4 en astrocitos, indican que la única sobreexpresión de la Cdk4 no es suficiente para la formación de tumores [179].

Cabe destacar también que la sobreexpresión de la ciclina D1 (subunidad reguladora de la Cdk4) bajo el control del promotor de insulina de rata (Tg RIP- Ciclina D1) lo cual dirige la expresión específicamente en la célula β , también causa una hiperplasia de la célula β debido a una tasa de proliferación superior a la del grupo control (si bien esto no se observa hasta los 12 meses). El test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa de los animales Tg RIP- Ciclina D1 da resultados similares a los de los animales control. No se detecta hipoglicemia ni en ayunas ni en estado post-prandrial. Además, el estímulo proliferativo provocado por la Ciclina D1 no es tumorogénico, ya que no observan tumores β celulares incluso en animales Tg RIP- Ciclina D1 de más de 2 años de edad [100].

Es importante considerar que aunque el modelo genomodificado Cdk4R24C pueda tener un fenotipo muy extremo (con la posibilidad de desarrollo de tumores a edades avanzadas), cabe tener en cuenta la posibilidad de generar modelos más leves de regulación de la Cdk4 como aproximación para aumentar la masa β celular. En esta línea, los animales heterocigotos para la mutación R24C tienen una menor incidencia de tumores [53]. Otra potencial aproximación sería el uso de nutrientes y factores de crecimiento inductores de la mitogénesis de la célula β . Factores como HGF, PTHrP, lactógenos, insulina y GLP-1 aumentan la proliferación de la célula β y expanden la masa β -celular tanto *in vitro* como *in vivo* [86].

Se necesita un conocimiento más profundo de las vías que conducen a la activación del complejo ciclina D-Cdk4 para poder entender mejor la regulación del crecimiento del islote. Ello conduciría al desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas de la diabetes. Recientemente, se ha demostrado que la vía de la PI 3-kinasa/Akt es crucial en la regulación de la masa beta celular [28]. Las señales inducidas por AKT, están mediadas totalmente por

la Cdk4, que a su vez fosforila la proteína del retinoblastoma. Aunque la ausencia total de la Cdk4 impide a Akt realizar su función, a niveles medios de Cdk4 (heterocigotos), la Akt es capaz de compensar la falta del 50% de los niveles de Cdk4. Animales transgénicos que presentan una activación constitutiva de la Akt (caAkttg/Cdk4+/+) en la célula β , presentan un incremento en la fosforilación de FOXO1 (la fosforilación de FOXO1 por Akt provoca su exclusión del núcleo y por tanto deja de ejercer su función de arresto de parada del ciclo celular [180, 181]), niveles superiores de insulinemia tanto en ayunas como en estado post-prandial y un aclarado de la glucosa más rápido. A nivel del islote, el área de β -celular es superior en los animales caAkttg/Cdk4+/+ y también la proliferación por incorporación de Brdu [28].

Por tanto, la hiperplasia β pancreática generada por la mutación R24C, que provoca una hiperactivación de la Cdk4 por la imposibilidad de unión a la familia de inhibidores Ink4, no provoca ninguna alteración funcional y metabólica destacable a los dos meses de edad.

En la parte final de este bloque de resultados se ha demostrado que la Cdk4 es una diana potencial para la expansión de la célula β ex-vivo. La Cdk4R24C aumenta la proliferación de los islotes pancreáticos y esta proliferación es debida en gran medida a la replicación de la célula β .

Estudios recientes han demostrado que el trasplante de islotes humanos puede ser una terapia exitosa para el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 1 (DMT1) o insulino dependiente. Además, los niveles de mortalidad y morbilidad son inferiores a los producidos por el trasplante del páncreas entero [182]. El principal inconveniente para convertir el trasplante de islotes pancreáticos en una terapia a gran escala es el número de islotes necesarios para ello (12000 equivalentes de islote / kg de peso) y el escaso número de islotes que se disponen [183]. Normalmente son necesarios entre 2 y 3 donantes por paciente diabético receptor para poder reestablecer la normoglicemia [183]. Por este motivo la obtención de una fuente ilimitada de células β se ha convertido en un objetivo prioritario en la investigación terapéutica de la DMT1 [184]. La expansión de los islotes ex-vivo sería una posibilidad.

Utilizando dos aproximaciones experimentales distintas se ha observado que la infección lentiviral con la Cdk4R24C causa la replicación de la célula β pancreática, por una parte mediante inmunocitoquímica, por co-tinción de las células insulina+ y KI67+ (marcador de proliferación) y por otro lado, por análisis, mediante citometría de flujo, del número de células GLUT2 positivas en los islotes humanos infectados.

Se ha publicado un trabajo, donde se demuestra que la sobreexpresión en islotes humanos mediante vectores adenovirales de la ciclina D1 incrementa la proliferación de los islotes y la fosforilación de la proteína del retinoblastoma a las 72 horas post-infección [99]. Sin embargo, la infección adenoviral con la forma Cdk4 WT no provoca cambios significativos en la proliferación de la célula β mediante incorporación de timidina [99].

La elección en este estudio de la infección lentiviral en lugar de la infección adenoviral, responde al hecho que la infección lentiviral tiene una buena eficiencia de infección y la expresión de la proteína de interés puede estudiarse tanto a corto como a largo plazo, ya que el transgén de interés se integra en el genoma de la célula por recombinación. Además, al contrario que los vectores adenovirales, los vectores lentivirales no son inmunogénicos y esto facilitaría su posible utilidad como terapia génica [185]. Otro factor a tener en cuenta es la posibilidad que los vectores tienen de infectar células que no están en ciclo. Los retrovirus requieren la rotura que se produce en la membrana plasmática durante la mitosis para poder entrar en la célula. Los islotes humanos maduros tienen una baja tasa de proliferación que dificulta mucho la utilización de los retrovirus en este tipo celular, en cambio los lentivirus no requieren las células en división para poder infectarlas, con lo cual se gana en eficiencia de transfección [186].

En resumen, la Cdk4R24C es una proteína clave en la regulación de la proliferación de la célula β en humanos, por tanto puede jugar un papel fundamental en las futuras terapias de regeneración de la masa β -celular para el tratamiento de la DMT1.

13 Resultados (Objetivo III)

Los resultados previos de este trabajo (Objetivos I y II) demuestran que la mutación R24C en la proteína Cdk4 provoca un incremento significativo de la proliferación de la célula β , sin alterar su funcionalidad. El siguiente objetivo de la presente tesis fue determinar si las células β replicativamente activas debido a la mutación R24C en la Cdk4 (Cdk4R24C), son resistentes al ataque autoinmune en el fondo genético murino NOD, tal vez induciendo tolerancia inmunológica hacia los autoantígenos de la DMT1. En otras palabras, ¿podría la hiperplasia β -celular vencer a la autoinmunidad? (Figura IV.11).

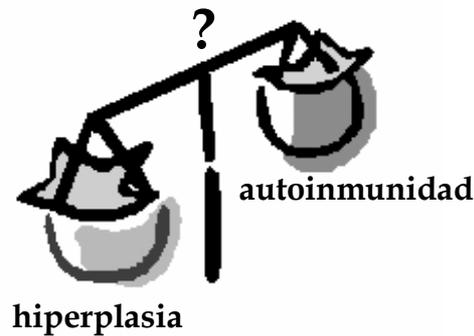


Figura IV.11. Hipótesis de trabajo. Ante el ataque autoinmune producido en la DMT1, ¿podrá una continua hiperactivación de la Cdk4 y por tanto una hiperproliferación de la célula β contrarrestar la autoinmunidad, inducir tolerancia y mantener la normoglicemia?

Para llevar a cabo esta parte del trabajo, se retrocruzó el modelo Cdk4R24C CD1/129 Sv al fondo genético NOD/Ltj para obtener ratones que expresaran la Cdk4R24C en una cepa con predisposición genética a padecer DMT1, como es el caso de la cepa NOD/Ltj. Se realizó un retrocruzamiento intensivo hasta alcanzar la generación N12 (11 retrocruzamientos). Al alcanzar esta última generación (N12), todos los individuos eran homocigotos para los alelos NOD de susceptibilidad a la diabetes testados (ver tabla apartado 7.1.3.2). Además, la incidencia acumulativa de diabetes en las hembras WT era del 90% (igual a la de la cepa NOD/Ltj), lo cual indica un fondo genético plenamente NOD.

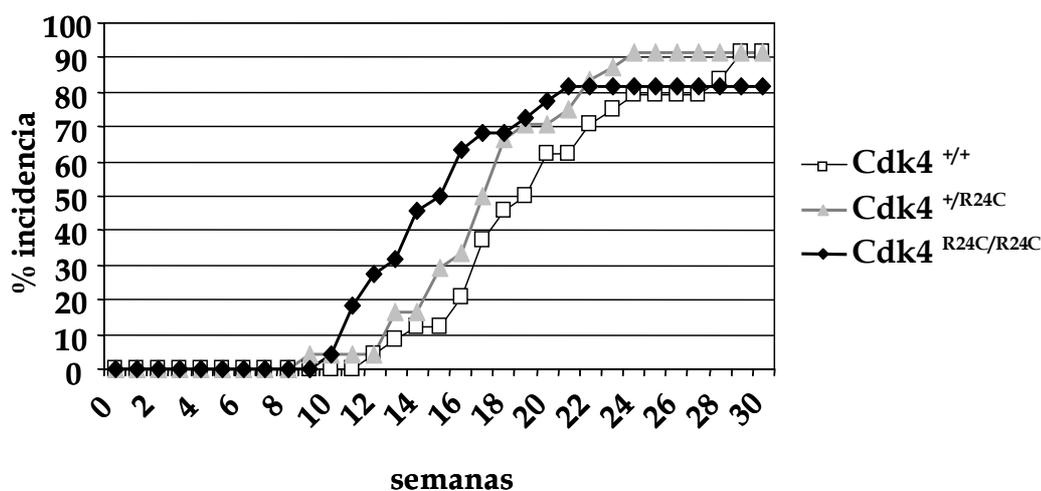
Todos los estudios de esta parte del trabajo se realizaron con ratones prediabéticos de 6-7 semanas de edad, salvo excepciones especificadas en el texto.

Además, dada la diferencia en la incidencia de diabetes en la cepa NOD/Ltj en función del género, se realizaron por separado estudios en machos y hembras.

13.1 Incidencia de diabetes en la cepa Cdk4R24C NOD

En primer lugar se realizó un seguimiento de la historia natural de la diabetes en los individuos de la cepa Cdk4R24C NOD, mediante controles semanales de la glucosuria desde la semana 8 hasta la semana 30 y controles de glicemia una vez detectada la glucosuria. Se monitorizó la aparición de la diabetes tanto en machos como en hembras (ver figura IV.12).

a) Hembras



b) Machos

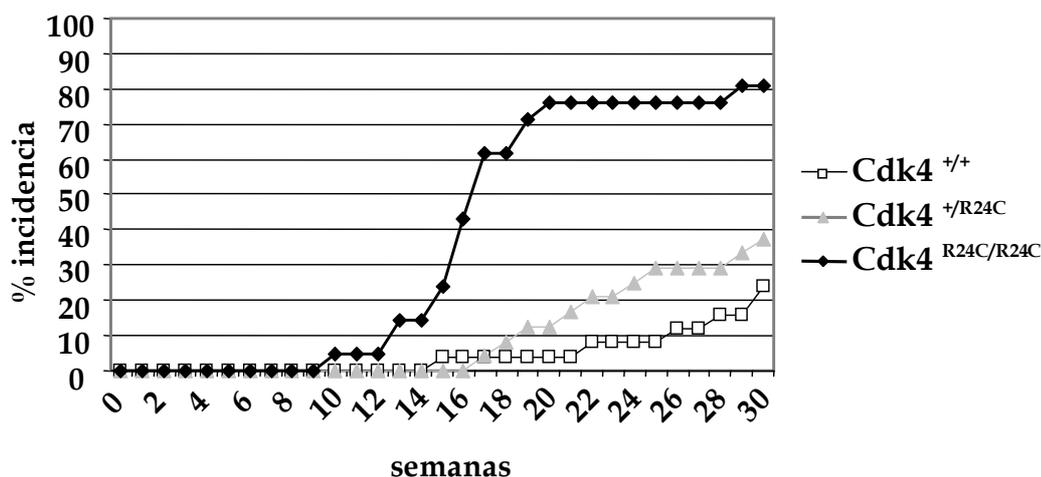


Figura IV.12. Incidencia de diabetes en los ratones Cdk4R24C NOD. **a)** incidencia de diabetes en las hembras (Cdk4^{+/+} n=25; Cdk4^{+/R24C} n=24; Cdk4^{R24C/R24C} n=22); **b)** incidencia de diabetes en los machos (Cdk4^{+/+} n=25; Cdk4^{+/R24C} n=26; Cdk4^{R24C/R24C} n=24).

Contrariamente a lo esperado, la mutación $Cdk4^{R24C}$ no sólo no retrasa la aparición de la diabetes en el fondo genético NOD, sino que la acelera.

En el caso de los machos (Figura IV.12b), la incidencia acumulativa de diabetes es claramente superior en el caso de los homocigotos ($Cdk4^{R24C/R24C}$) a las 30 semanas (81%), comparado con los WT ($Cdk4^{+/+}$) (24%). También los machos heterocigotos ($Cdk4^{+/R24C}$) muestran una incidencia superior de diabetes (38%) respecto a la mostrada por el grupo $Cdk4^{+/+}$ (24%). Esto está indicando que el impacto de la mutación $Cdk4^{R24C}$ es dosis-dependiente. También se observan diferencias en la cinética de la aparición de la enfermedad. Mientras el grupo $Cdk4^{+/+}$ presentan los primeros casos a las 15 semanas de edad, los individuos $Cdk4^{R24C/R24C}$ lo hacen ya a las 10 semanas. En el caso de los individuos $Cdk4^{+/R24C}$ no es hasta la semana 17 cuando aparecen los primeros diabéticos.

En cuanto a las hembras portadoras de la mutación $Cdk4^{R24C}$, éstas no tienen una incidencia de diabetes superior a la de las hembras WT (Figura IV.12a). Los grupos experimentales $Cdk4^{+/+}$ y $Cdk4^{+/R24C}$ muestran la misma incidencia acumulativa de diabetes (91%), mientras que el grupo $Cdk4^{R24C/R24C}$ muestra una incidencia ligeramente inferior (81%). Sin embargo, esta diferencia puede considerarse despreciable. Donde sí observamos diferencias es en la cinética de la aparición de la enfermedad: el grupo $Cdk4^{+/R24C}$ presenta los primeros casos de la enfermedad ya a las 9 semanas, una semana después, a las 10 semanas, se presentan los primeros casos de los individuos $Cdk4^{R24C/R24C}$ y no es hasta la semana 12 que se presentan los primeros casos de diabetes en los individuos de genotipo $Cdk4^{+/+}$. Además, se produce una aceleración en la aparición de diabetes durante las primeras semanas de edad que es dosis-dependiente, aunque finalmente a edades avanzadas los valores de incidencia acumulativa prácticamente se igualen. A las 16 semanas de edad, los ratones $Cdk4^{R24C/R24C}$ presentan una incidencia del 63%, los $Cdk4^{+/R24C}$ del 33% y los $Cdk4^{+/+}$ del 20%. Estas diferencias dosis-dependientes se van manteniendo hasta la semana 21 aproximadamente, cuando los valores de incidencia acumulativa de diabetes se equiparan.

En resumen, la incidencia de diabetes en los machos $Cdk4^{R24C}$ NOD es muy superior a la de los individuos $Cdk4^{+/+}$ y el efecto es claramente dosis-dependiente. Las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$, en cambio, no tienen una incidencia superior. Esto puede ser debido a la elevada incidencia que presentan las hembras WT *per se* (91%), y que dificulta la apreciación de diferencias. Sin embargo, sí que se aprecian diferencias en la edad de inicio de la enfermedad y en la cinética de aparición de la misma. En las primeras semanas del estudio hasta la semana 21 aproximadamente, los animales $Cdk4^{R24C/R24C}$ y los $Cdk4^{+/R24C}$ presentan

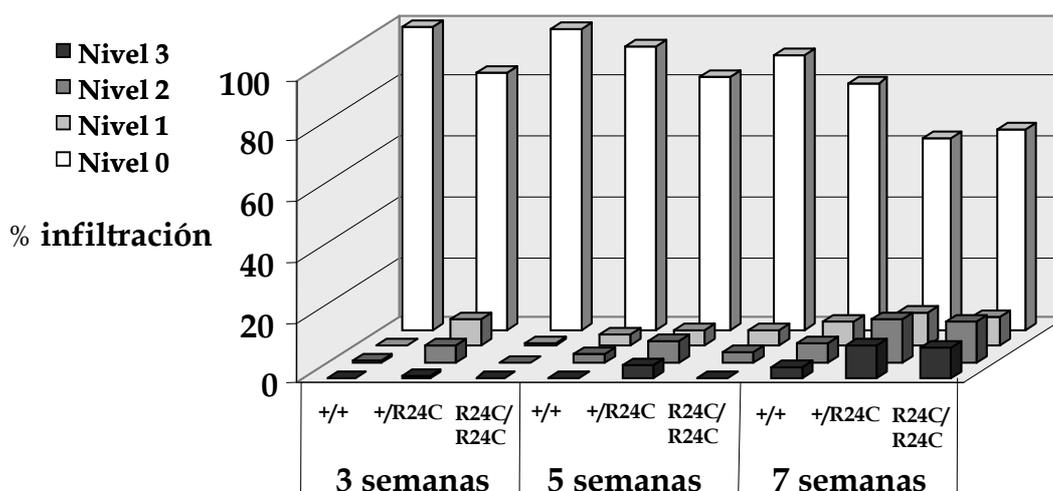
niveles superiores de incidencia que los animales Cdk4^{+/+} y este efecto es dosis-dependiente, ya que la presencia de dos alelos R24C tiene un mayor efecto acelerando la aparición de la enfermedad.

13.2 Infiltración linfocitaria

Para constatar que la infiltración linfocitaria pancreática era la causa de la aparición de la hiperglicemia y por tanto de la diabetes en los ratones Cdk4R24C NOD, es decir, confirmar la etiología autoinmune de la enfermedad, se procedió al análisis de la infiltración de los páncreas de los animales Cdk4R24C NOD.

Se observaron cortes de páncreas teñidos con hematoxilina/eosina y se analizaron los islotes y su grado de infiltración (ver apartado 8.5 de determinación del grado de infiltración de materiales y métodos). Se realizaron análisis de los islotes de ambos sexos a distintas edades (ver figura IV.13).

a) Hembras



b) Machos

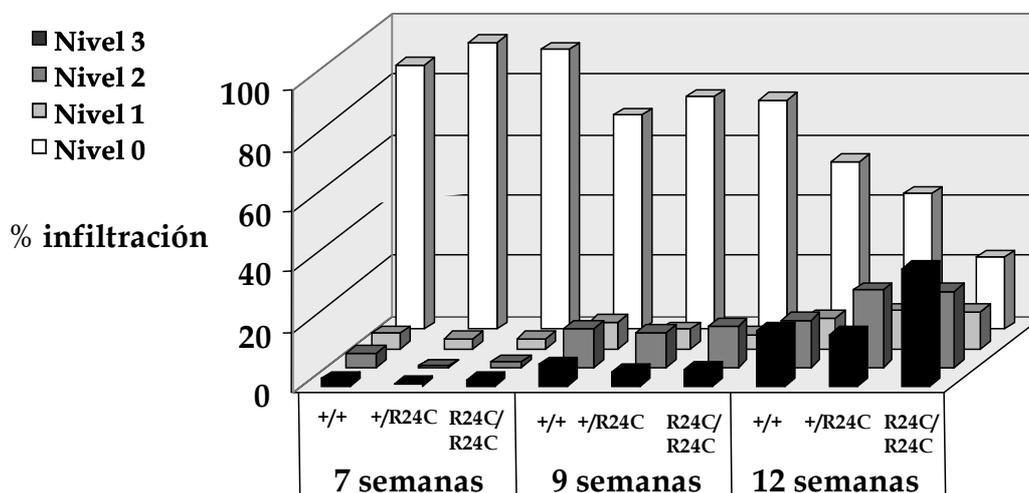


Figura IV.13. Infiltración linfocitaria de los islotes de los ratones Cdk4R24C. a) infiltración linfocitaria pancreática en las hembras; b) infiltración linfocitaria pancreática en los machos. Los datos son resultado de 3 niveles distintos de n=6 animales por cada grupo experimental y sexo (>90 islotes/grupo experimental).

Los datos de infiltración linfocitaria pancreática reproducen en cierto modo lo que ya se apreciaba en las curvas de incidencia acumulativa de diabetes. En el caso de las hembras (Figura IV.13a), a las 3 y 5 semanas de edad, se observa que los individuos Cdk4^{+/R24C} tienen una mayor infiltración comparado con los otros dos grupos, y que explicaría la aparición más temprana de los primeros casos de diabetes en este grupo. A las 7 semanas tanto las hembras Cdk4^{+/R24C} como las hembras Cdk4^{R24C/R24C} presentan una mayor infiltración linfocitaria, lo cual explicaría la evolución más acelerada de la diabetes en estos dos grupos que en el grupo de animales WT (Cdk4^{+/+}).

En el caso de los machos, se aprecia que los niveles de infiltración son ligeramente superiores en los individuos Cdk4^{+/+} comparado con los Cdk4^{+/R24C} y los Cdk4^{R24C/R24C}, a las 7 y 9 semanas de edad, pero al llegar a las 12 semanas, edad de inicio del debut en la mayoría de grupos, este patrón se invierte totalmente y son claramente los individuos Cdk4^{R24C/R24C} seguidos por los Cdk4^{+/R24C}, los que tienen unos niveles de infiltración linfocitaria superiores. Este hecho correspondería con la rápida aceleración de la enfermedad en estos dos grupos a partir de la semana 12, comparado con la lenta evolución de la enfermedad observada en el grupo control Cdk4^{+/+}.

A partir de estos inesperados resultados, se plantearon las siguientes 2 explicaciones:

- A) La mutación, que es ubicua en todas las células del organismo, está afectando también a la población linfocitaria, volviéndola más agresiva y acelerando así el proceso autoinmune; y/ó
- B) La hiperplasia de la célula β pancreática está aumentando la sensibilidad del islote al ataque autoinmune.

Con el fin de dilucidar la causa de los fenotipos observados, se decidió comprobar ambas hipótesis.

A) Efecto de la mutación Cdk4R24C sobre la población linfocitaria

Para abordar esta cuestión realizamos distintas aproximaciones experimentales:

13.3 Transferencia adoptiva de linfocitos procedentes de los distintos grupos experimentales estudiados a ratones NOD/SCID

Para averiguar si los linfocitos de los ratones $Cdk4^{R24C/R24C}$ y $Cdk4^{+/R24C}$ eran más diabetogénicos que los linfocitos de los ratones $Cdk4^{+/+}$, se transfirieron 10 millones de esplenocitos de ratones prediabéticos (6-7 semanas) a ratones NOD/SCID y posteriormente se observó la incidencia de diabetes (Figura IV.14). La edad de 6-7 semanas para el donante se escogió en base al análisis de la infiltración linfocitaria previamente discutida (apartado 15.2). A las 6-7 semanas de edad, los linfocitos tienen que haber tenido ya contacto con los antígenos pancreáticos, sea cual sea el genotipo estudiado.

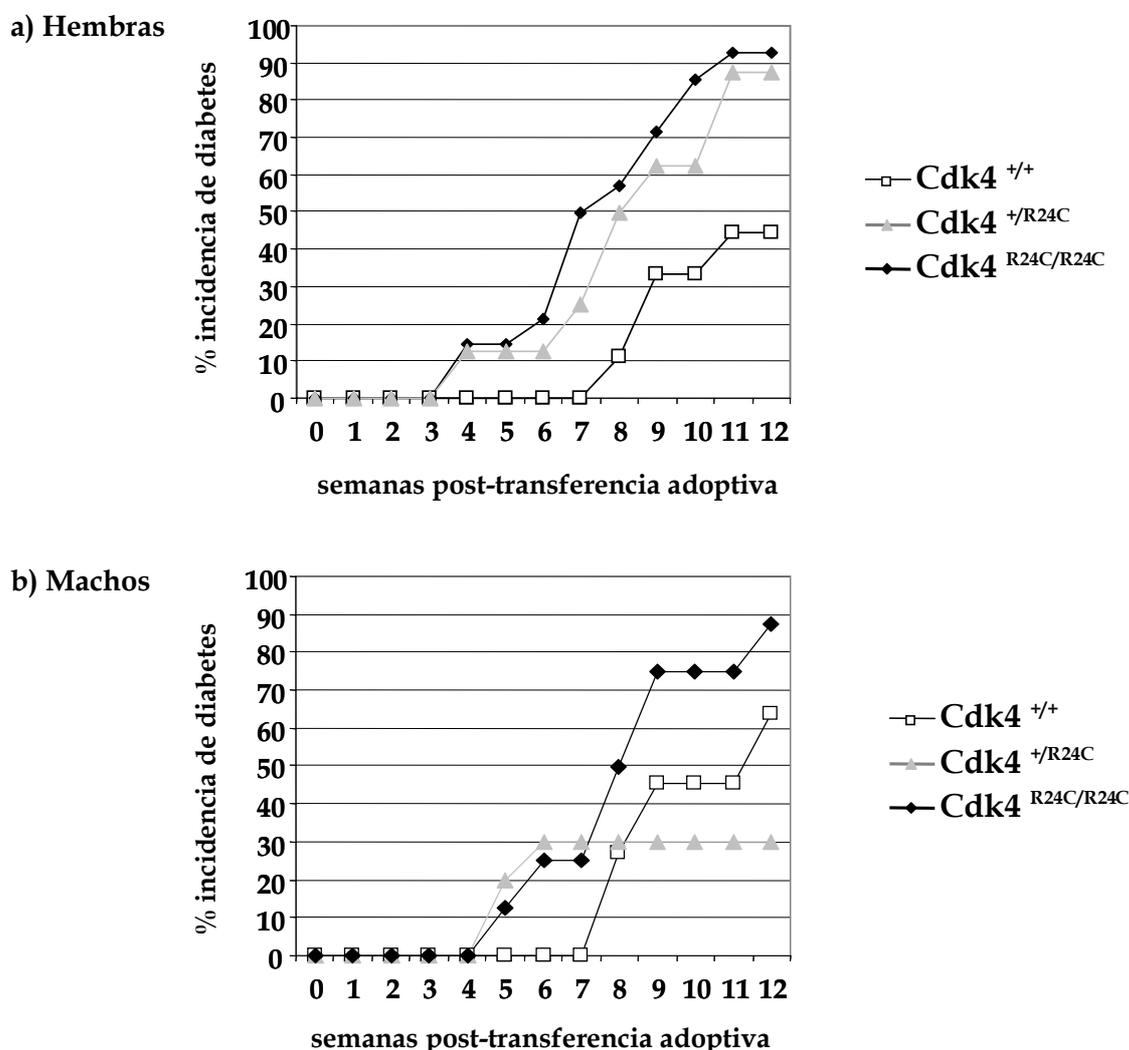


Figura IV.14. Transferencia adoptiva de esplenocitos de ratones $Cdk4^{R24C}$ a ratones NOD/SCID. **a)** Transferencia de 10 millones de esplenocitos de hembras pre-diabéticas a hembras NOD/SCID ($Cdk4^{+/+}$ n=9; $Cdk4^{+/R24C}$ n=14; $Cdk4^{R24C/R24C}$ n=8); **b)** Transferencia de 10 millones de esplenocitos de machos pre-diabéticos a machos NOD/SCID ($Cdk4^{+/+}$ n=11; $Cdk4^{+/R24C}$ n=10; $Cdk4^{R24C/R24C}$ n=8).

Como se observa en la figura IV.14a, las hembras NOD/SCID inyectadas con esplenocitos de hembras $Cdk4^{+/R24C}$ y $Cdk4^{R24C/R24C}$ pre-diabéticas presentan diabetes exacerbada a las 4 semanas en comparación con las hembras NOD/SCID inyectadas con esplenocitos de hembras $Cdk4^{+/+}$ que exhiben la enfermedad a partir de las 8 semanas post-transferencia. Además, la incidencia acumulativa de diabetes también es superior cuando los esplenocitos donantes contienen la mutación R24C (87% $Cdk4^{R24C/R24C}$, 92% $Cdk4^{+/R24C}$, 44% $Cdk4^{+/+}$).

Los machos también muestran una aceleración en la aparición de la diabetes cuando han sido transferidos con los linfocitos procedentes de machos $Cdk4^{+/R24C}$ y $Cdk4^{R24C/R24C}$ prediabéticos (5 semanas) respecto a los linfocitos procedentes de los machos $Cdk4^{+/+}$ (8 semanas). Sin embargo, la incidencia de diabetes presenta ciertas diferencias, mientras que los linfocitos de los ratones $Cdk4^{R24C/R24C}$ causan un aumento en la incidencia de diabetes (87%) respecto a los linfocitos de los ratones control $Cdk4^{+/+}$ (63%), la incidencia de diabetes causada por la presencia de los linfocitos $Cdk4^{+/R24C}$ es inferior (30%) a pesar de inducir la aceleración en la aparición de la diabetes una vez transferidos (ver más adelante la caracterización de los marcadores de activación en la superficie linfocitaria, apartado 15.8).

Por tanto, los linfocitos de los ratones $Cdk4^{R24C}$ pre-diabéticos tienen una capacidad diabetogénica aumentada con respecto a los linfocitos de los ratones pre-diabéticos WT. Ello puede ser la causa de la aceleración de la diabetes observada en la historia natural.

13.4 Proliferación in vitro de los esplenocitos

Al observar que los linfocitos de los ratones $Cdk4^{R24C}$ NOD pre-diabéticos son más diabetogénicos, se intentó averiguar si podría ser causa de una mayor proliferación y una mayor presencia de células autoreactivas.

Para ello se realizó un estudio de proliferación in vitro, mediante la medida de la incorporación de timidina- 3H de los linfocitos del bazo (esplenocitos) (Figura IV.16) y de los linfocitos de los nódulos linfáticos pancreáticos procedentes de ratones pre-diabéticos (Figura IV.17), en respuesta a distintos autoantígenos reconocidos de la cepa NOD, así como un estímulo policlonal anti-CD3 como control positivo de la proliferación.

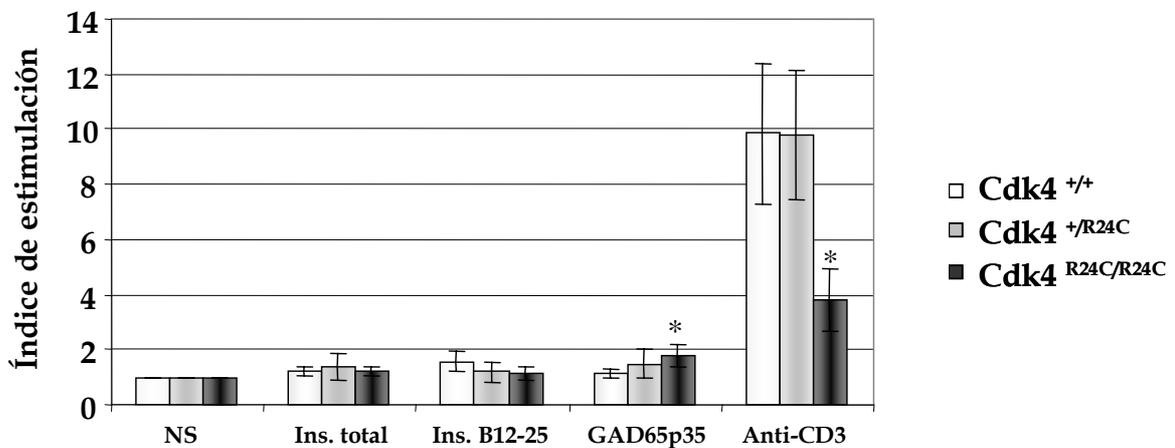
Tal y como se observa en la figura IV.16a, la respuesta proliferativa de los esplenocitos totales de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ frente al estímulo péptido GAD65p35 ($1,79 \pm 0,42$), es superior al de los de las hembras $Cdk4^{+/+}$ ($1,14 \pm 0,18$). Así pues, la autorreactividad frente al

autoantígeno GAD65p35 se ve afectada positivamente por la mutación R24C en las hembras NOD a nivel esplénico.

Ante el estímulo policlonal por anti-CD3, los linfocitos de las hembras $Cdk4^{+/+}$ ($9,8 \pm 2,56$) y $Cdk4^{+/R24C}$ ($9,79 \pm 2,34$) proliferan más que los linfocitos de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ ($3,8 \pm 1,1$). Ello puede estar indicando una mayor sensibilidad de los linfocitos R24C a la AICD (apoptosis induced cell death).

En los machos (figura IV.16b) no se observan diferencias en la proliferación ante ninguno de los estímulos utilizados.

a) Esplenocitos Hembras



b) Esplenocitos Machos

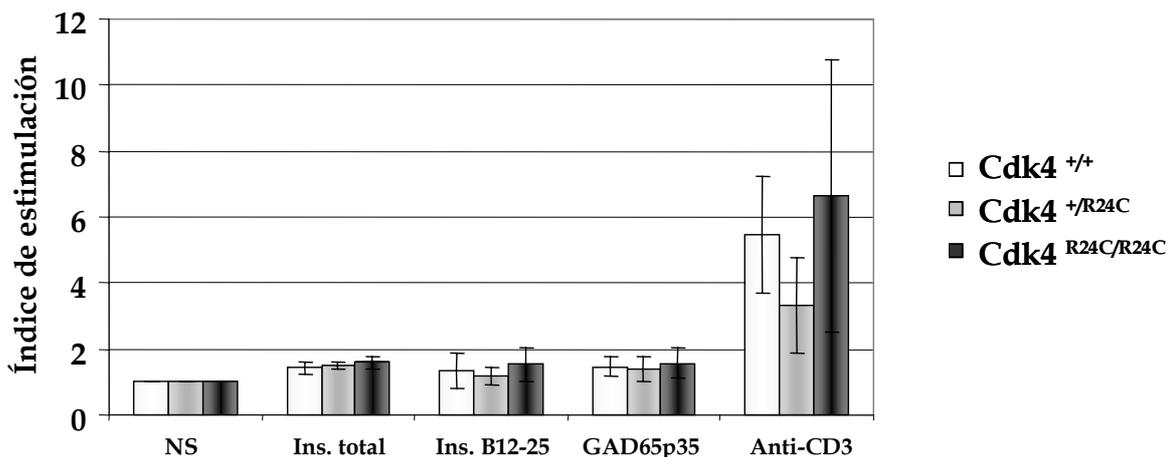


Figura. IV.16. Índice de estimulación de los esplenocitos en respuesta a distintos estímulos. NS (No estimulados); Ins total (molécula entera de insulina); Ins. B12-25 (péptido autoantigénico de la cadena B de la insulina a.a. 12-25); GAD65p35 (péptido autoantigénico de GAD65); Anti-CD3 (anticuerpo contra CD3 con efecto agonista). **a)** Índice de estimulación de las hembras; **b)** Índice de estimulación

de los machos. Los datos corresponden a un mínimo de $n=6$ experimentos distintos. $*p<0,05$. Los resultados se expresan como media \pm SD del índice de estimulación= Proliferación (estímulo) / Proliferación (basal).

13.5 Proliferación basal de los esplenocitos

Se midieron las proliferaciones basales (sin estímulo) de los esplenocitos de machos y de hembras pre-diabéticos (Figura IV.17). Se apreció que la proliferación basal en el caso de los machos era superior en los individuos $Cdk4^{+/R24C}$ y $Cdk4^{R24C/R24C}$ (2150 cpm y 2658 cpm respectivamente) respecto a los individuos $Cdk4^{+/+}$ (1085 cpm). Sin embargo, en el caso de las hembras, no se observan estas diferencias, aunque existe cierta tendencia en los individuos $Cdk4^{+/R24C}$ respecto a los $Cdk4^{+/+}$ a superar los valores de proliferación basal.

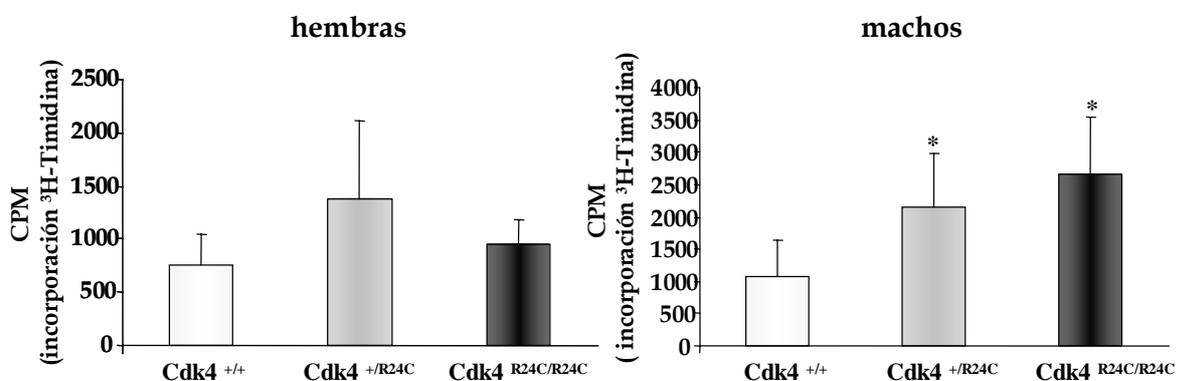


Figura IV.17. Proliferación basal de los esplenocitos de los ratones $Cdk4^{R24C}$ NOD. Izquierda: hembras ($Cdk4^{+/+}$ $n=9$; $Cdk4^{+/R24C}$ $n=4$; $Cdk4^{R24C/R24C}$ $n=6$); Derecha: machos ($Cdk4^{+/+}$ $n=8$; $Cdk4^{+/R24C}$ $n=8$; $Cdk4^{R24C/R24C}$ $n=5$). $*p<0,05$. Media \pm SD.

Por tanto, las hembras no presentan variación en la proliferación basal de sus esplenocitos en ninguno de sus genotipos. En cambio, los machos presentan una proliferación esplenocítica basal en los genotipos $Cdk4^{+/R24C}$ y $Cdk4^{R24C/R24C}$ superior y dosis-dependiente respecto a la de los individuos $Cdk4^{+/+}$. Esta mayor proliferación basal podría explicar la diabetes exacerbada de los machos $Cdk4^{+/R24C}$ y $Cdk4^{R24C/R24C}$ respecto de los machos $Cdk4^{+/+}$, la cual, a su vez, es dosis-dependiente. Además, la menor proliferación basal de los linfocitos $Cdk4^{+/R24C}$ respecto de los $Cdk4^{R24C/R24C}$ explicaría la menor incidencia de diabetes en los recipientes de los linfocitos transferidos procedentes de los individuos $Cdk4^{+/R24C}$ respecto de los WT.

13.6 Inducción de apoptosis por estímulo con anti-CD3

Analizando la proliferación in vitro de los esplenocitos de las hembras frente al estímulo policlonal anti-CD3, se observó que el índice de estimulación de los linfocitos de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ ($3,8 \pm 1,1$) era inferior al índice de proliferación de los linfocitos $Cdk4^{+/+}$ ($9,8 \pm 2,5$) (ver figura IV.16a). La aceleración de la diabetes que produce la transferencia adoptiva in vivo de estos linfocitos, sugiere un estado de activación superior. Se hipotetizó que la repetida estimulación con anti-CD3 in vitro de dichos linfocitos hiperactivos como los $Cdk4^{R24C/R24C}$ podría estar provocando su apoptosis.

En primer lugar se comprobaron los niveles de expresión de la molécula CD3 en la superficie de los linfocitos mediante citometría de flujo. Los linfocitos de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ presentan una media de expresión de CD3 (x-mean) de $93,7 \pm 2,6$ ($n=3$) mientras que los linfocitos de las hembras $Cdk4^{+/+}$ presentan una x-mean de $76,3 \pm 3,2$ ($n=4$). Es decir, que los linfocitos de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ muestran unos niveles superiores de CD3 en su superficie ($p < 0,005$).

Se realizó un ensayo mediante citometría de flujo de la apoptosis inducida por anti-CD3 de los linfocitos T CD4 y CD8 utilizando la anexina como marcador de apoptosis (ver apartado 10.7) (Figura IV.18).

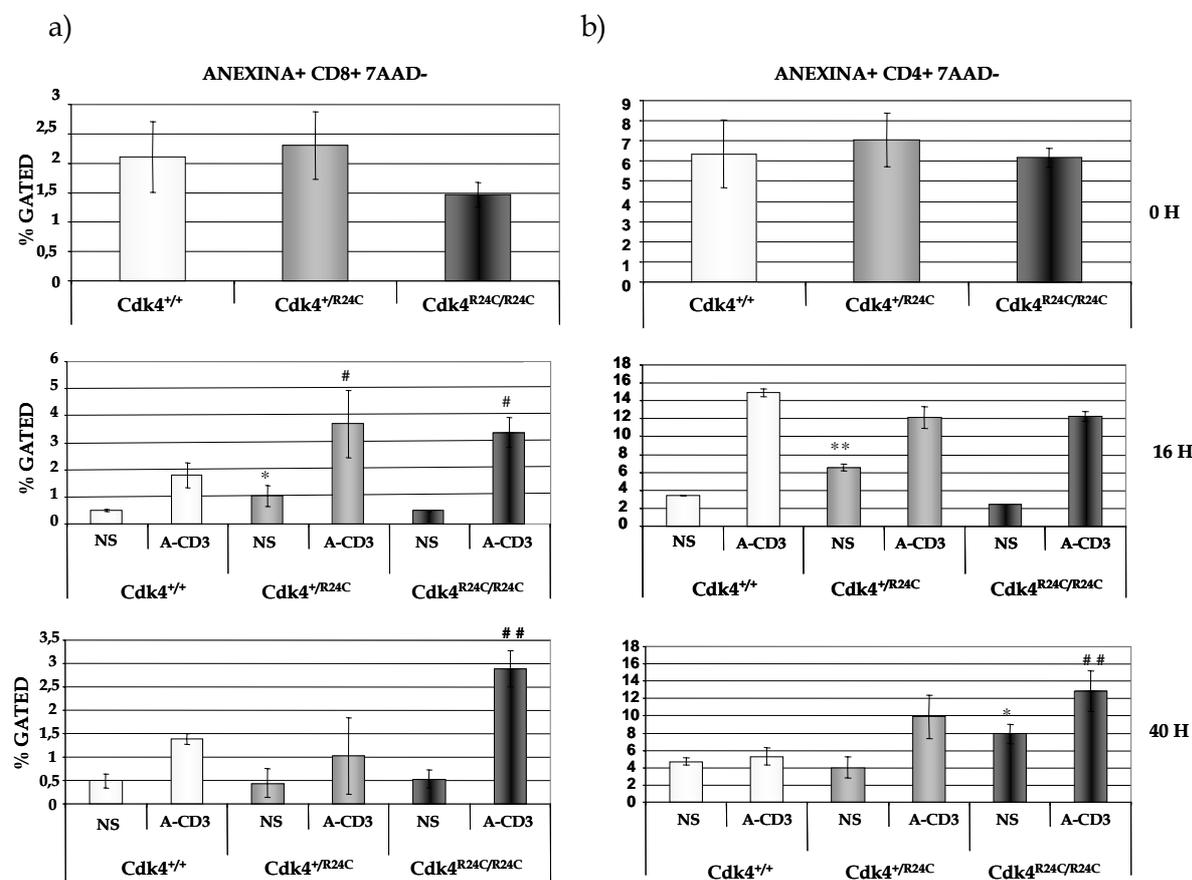


Figura IV.18. % células apoptóticas (Anexina + / 7AAD -) inducida por el estímulo de anti-CD3 en linfocitos de hembras a distintos tiempos de cultivo. **a)** Apoptosis de los linfocitos T CD8. **b)** Apoptosis de los linfocitos T CD4. *,# p<0,05; **, ## p<0,005. n=3 por condición.(*) compara el % de apoptosis de los linfocitos Cdk4R24C (NS) con respecto a los linfocitos WT (NS). (#) compara el % de apoptosis de los linfocitos Cdk4R24C (A-CD3) con respecto a los linfocitos WT (A-CD3).

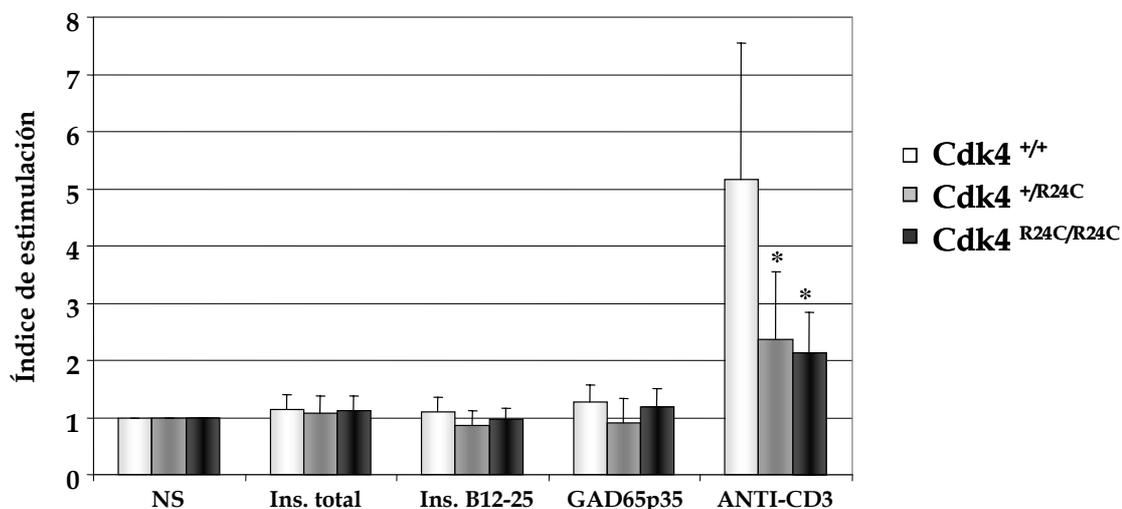
A las 16 h post cultivo se observa como existe un aumento de apoptosis en los linfocitos T CD8 Cdk4^{+/R24C} y Cdk4^{R24C/R24C} estimulados con anti-CD3 (3,69±1,23; 3,36±0,55 respectivamente) respecto a la población Cdk4^{+/+} (1,78±0,45). También se observa un aumento de la apoptosis de los linfocitos T CD4 y CD8 Cdk4^{+/R24C} sin estimular a las 16 h (6,52±0,96; 1,034±0,38) respecto a la población WT (3,41±1,17; 0,50±0,04). Se aprecia también un aumento de la apoptosis de los linfocitos T CD4 sin estimular de los animales Cdk4^{R24C/R24C} (7,9±1,14) respecto de la apoptosis de los linfocitos T CD4 sin estimular de los ratones WT (4,68±0,4). Este aumento de apoptosis es más relevante a las 40 h de cultivo, cuando se observa que los linfocitos T CD4 y CD8 de los animales Cdk4^{R24C/R24C} tienen un aumento de apoptosis en presencia de anti-CD3 (12,89±2,34; 2,89±0,38 respectivamente) respecto a los linfocitos T de los animales Cdk4^{+/+} (5,31±0,98; 1,38±0,11 respectivamente).

Por tanto, la disminución de la proliferación en respuesta a la activación por A-CD3 de los esplenocitos de las hembras Cdk4^{R24C/R24C} con respecto a aquella observada en las hembras Cdk4^{+/+} puede ser debida a la apoptosis aumentada en horas previas a la incorporación de la timidina. Dichos linfocitos presentan niveles superiores de CD3 en su superficie que les haría ser más susceptibles a la apoptosis inducida por activación (AICD).

13.7 Proliferación in vitro de los linfocitos de los nódulos linfáticos pancreáticos

Del mismo modo que se habían realizado los ensayos de la proliferación linfocitaria a partir de esplenocitos de individuos pre-diabéticos (ver apartado 12.4), se analizó la actividad proliferativa de los linfocitos procedentes de los nódulos linfáticos pancreáticos de individuos pre-diabéticos (Figura IV.19). La respuesta inmunitaria se organiza a nivel local, en los nódulos pancreáticos que drenan el páncreas, y a nivel de los mismos islotes pancreáticos una vez activados. Por esta razón, es de vital importancia estudiar el fenotipo del repertorio mononuclear presente en dichos nódulos linfáticos.

a) Nódulos linfáticos de hembras



b) Nódulos linfáticos de machos

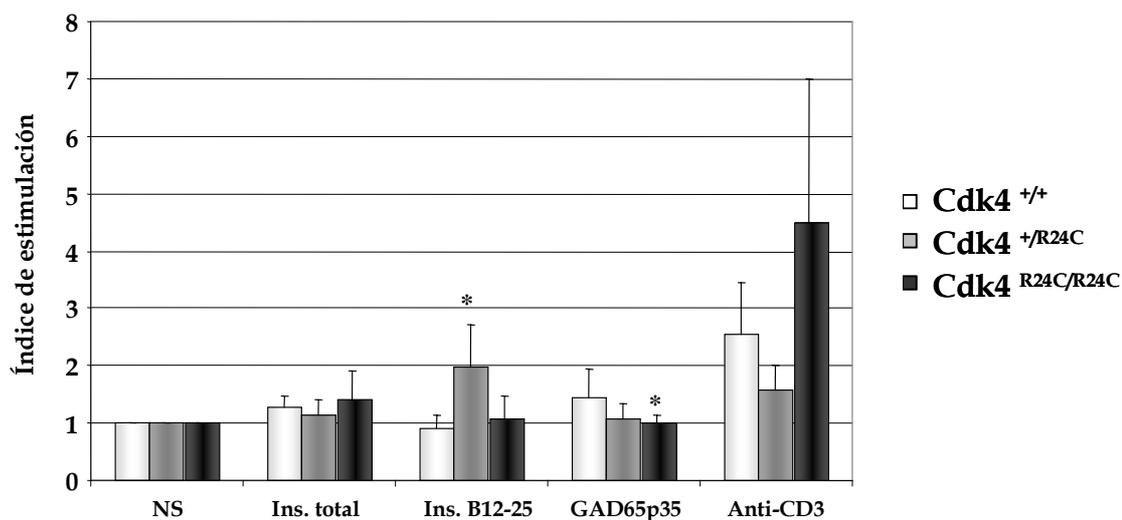


Figura IV.19. Índice de estimulación proliferativa de los linfocitos procedentes de nódulos linfáticos pancreáticos. **a)** Índice de estimulación de los linfocitos de las hembras. **b)** Índice de estimulación de los linfocitos de los machos. Los datos corresponden a un mínimo de n=6 experimentos distintos. * $p < 0,05$. Los resultados se expresan como media \pm SD del índice de estimulación = Proliferación (estímulo) / Proliferación (basal).

Coincidiendo con lo observado en esplenocitos (figura IV.16a), los linfocitos procedentes de los nódulos linfáticos pancreáticos de las hembras *Cdk4*^{+/R24C} y *Cdk4*^{R24C/R24C}, proliferan menos frente al anticuerpo agonista anti-CD3 ($2,3 \pm 1,1$ y $2,1 \pm 0,7$ respectivamente) comparado con los linfocitos de las hembras *Cdk4*^{+/+} ($5,1 \pm 2,3$) (Figura IV.19a).

Los linfocitos de los machos $Cdk4^{+/R24C}$ (Figura IV.19b) presentan, por una parte, un índice de estimulación superior frente al estímulo del péptido de insulina B12-25 ($1,9 \pm 0,7$) comparado con los linfocitos $Cdk4^{+/+}$ ($0,89 \pm 0,22$), por otra parte, los linfocitos de los animales $Cdk4^{R24C/R24C}$ no responden tanto al estímulo del péptido GAD65p35 ($0,9 \pm 0,1$), comparado con los individuos $Cdk4^{+/+}$ ($1,4 \pm 0,4$).

Por lo que respecta a las proliferaciones basales, no existen diferencias significativas ni en machos, ni en hembras.

Por tanto, los linfocitos procedentes de los nódulos linfáticos pancreáticos de las hembras $Cdk4^{R24C}$ no responden ante los distintos antígenos autoantigénicos estudiados de un modo superior. Sin embargo, se observa una proliferación inferior ante el estímulo policlonal anti-CD3 de los linfocitos de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$, en respecto a los linfocitos de las hembras WT. Posiblemente sea debido también a la inducción de apoptosis por la estimulación repetida con el anticuerpo anti-CD3. Se puede sospechar que esta proliferación sea en realidad superior en etapas iniciales del ensayo in vitro y que esté enmascarada por la inducción de apoptosis debido a una mayor proliferación, no detectada inicialmente frente al estímulo policlonal, como se había mostrado que sucedía en el caso de los esplenocitos (ver figura IV.18).

13.8 Caracterización linfocitaria

Además del estudio de la respuesta proliferativa de los linfocitos, se realizó una caracterización de distintos marcadores de superficie de los linfocitos y macrófagos de animales prediabéticos de 6-7 semanas procedentes del bazo (Tabla IV.1, IV.2 y IV.3) y de los nódulos linfáticos pancreáticos (Tabla IV.4) mediante citometría de flujo. En las tablas se muestran los marcadores que mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales (en el anexo 3 se muestran todos los marcadores de superficie analizados).

ESPLENOCITOS:

hembras	Esplenocitos				Macrófagos		
	CD19+ CD25+	CD19+CD69+ CD25+	CD8+ FAS+	CD4+ CD62L+	CDIIb+ FA80-F +	CDIIb+ MAC3+	IAd+ CDIIb+
$Cdk4^{+/+}$	0,90	0,22	3,71	27,21	30,41	51,57	46,73
$Cdk4^{+/R24C}$	0,66	0,80 *	5,60 *	23,37 *	26,36	56,13	36,29 *
$Cdk4^{R24C/R24C}$	0,38 *	0,20	6,11 *	22,81 *	12,54 *	30,09 *	45,88

Tabla. IV.1. Caracterización de linfocitos y macrófagos procedentes del bazo de hembras Cdk4^{R24C/R24C} NOD. Porcentaje respecto a la población de linfocitos total. *p<0,05. Los resultados corresponden a un mínimo de 3 experimentos por grupo.

Como muestra la tabla IV.1, las hembras Cdk4^{R24C/R24C} tienen unos niveles de activación de los linfocitos B (CD19⁺ CD25⁺) inferiores a la población WT (Cdk4^{+/+}) (0,90±0,1 y 0,38±0,06 respectivamente). Sin embargo, los niveles de CD19⁺ CD69⁺ CD25⁺ son superiores en la población Cdk4^{R24C/+} (0,80±0,2 vs. 0,2±0,04 Cdk4^{+/+}). Se observan también unos niveles superiores de FAS en los linfocitos T CD8 (CD8⁺ FAS⁺) en los animales Cdk4^{R24C/R24C} (6,11±1,37) y Cdk4^{R24C/+} (5,60±0,7) respecto a la población Cdk4^{+/+} y que los haría ser más susceptibles a padecer AICD. También encontramos niveles inferiores de células no estimuladas previamente CD4⁺ CD62L⁺ en los animales Cdk4^{R24C/R24C} y Cdk4^{R24C/+} (22,81±3,9 y 23,37±1,49 respectivamente) respecto a la población Cdk4^{+/+} (27,2±0,9). Este perfil denota un incremento en la susceptibilidad a AICD en los linfocitos CD8 en hembras, una menor activación de los linfocitos B, así como un incremento de la población activada a las 6-7 semanas de edad de las hembras.

Respecto a los macrófagos, las hembras Cdk4^{R24C/R24C} muestran unos niveles de activación de los macrófagos (CD11b⁺ MAC3⁺) (30,1±9,7) inferiores a los de la población Cdk4^{+/+} (51,5±6,6). Además, los niveles de células dendríticas (IAd⁺ CD11b⁺) son inferiores también (36,29± 2,33 de los Cdk4^{R24C/+} vs. 46,73±2,17 de los Cdk4^{+/+}).

En el caso de los machos (Tablas IV.2 y IV.3) los linfocitos de los individuos Cdk4^{R24C/R24C} presentan mayor activación de los linfocitos CD4⁺ (CD4⁺ CD25⁺ 6,6±0,6; CD4⁺ CD69⁺ 2,7±0,7) respecto a los linfocitos de los individuos WT (CD4⁺ CD25⁺ 2,61±0,64; CD4⁺ CD69⁺ 0,4±0,09) y menor susceptibilidad a padecer apoptosis (niveles de FAS inferiores) tanto de los linfocitos T CD4 (10,41±4,73) como de los linfocitos T CD8 (3,92±1,12) comparado con la población Cdk4^{+/+} (20,68±2,54 y 10,65±1 respectivamente). La frecuencia y estado de activación de los macrófagos esplénicos es superior en los machos Cdk4^{R24C/R24C} (CD11b⁺ FA80-F⁺ Cdk4^{R24C/R24C} 26,5±3 vs. 4,6±2,7 Cdk4^{+/+}); (CD11b⁺ MAC3⁺ 46,6±4,7 vs. 20,01±6,35 Cdk4^{+/+}) respectivamente.

Con respecto a los esplenocitos de los animales Cdk4^{+/R24C}, solamente muestran incremento de activación los linfocitos CD4 (CD4⁺ CD69⁺), pero el resto de marcadores son similares a los de los individuos WT, esto explicaría los resultados de la transferencia adoptiva (ver apartado 15.3).

Con estos resultados se demuestra la menor susceptibilidad de los linfocitos T de los machos $Cdk4^{R24C/R24C}$ a sufrir AICD, así como el aumento en el estado de activación basal de los linfocitos T CD8 y de los macrófagos.

Todas estas características fenotípicas se traducen en el fenotipo más diabotogénico de los esplenocitos $Cdk4^{R24C/R24C}$ en machos (ver figura IV.23b).

machos	Esplenocitos						
	CD4+ CD25+	CD3+ FAS+	CD8+ FAS+	CD3+CD8+ FAS +	CD4+ FAS+	CD4+ CD69+	IAd+ CDIIC+
$Cdk4^{+/+}$	2,61	35,69	10,65	8,72	20,68	0,38	2,42
$Cdk4^{+/R24C}$	2,54	33,55	10,58	9,29	6,16	2,54 *	1,13 *
$Cdk4^{R24C/R24C}$	6,58 *	15,16 *	3,92 *	5,46 *	10,41 *	2,71 *	1,02

Tabla IV.2 . Caracterización de los esplenocitos de los machos $Cdk4^{R24C}$ NOD. * $p < 0,05$. Los resultados corresponden a un mínimo de 3 experimentos por grupo.

machos	Macrófagos	
	CDIIB+ FA80-F+	CDIIB+ MAC3+
$Cdk4^{+/+}$	4,58	20,01
$Cdk4^{+/R24C}$	7,64	24,45
$Cdk4^{R24C/R24C}$	26,50 *	46,05 *

Tabla IV.3. Caracterización de los macrófagos procedentes del bazo de los machos $Cdk4^{R24C}$ NOD. * $p < 0,05$. Los resultados corresponden a un mínimo de 3 experimentos por grupo.

NÓDULOS LINFÁTICOS:

Los linfocitos procedentes de nódulos linfáticos pancreáticos (ver tabla IV.4b) de ratones machos $Cdk4^{R24C/+}$ cuentan con unos niveles superiores de linfocitos B activados (CD19+ CD69+ (9,76±1,6)) con respecto los animales $Cdk4^{+/+}$ (4,94±1,4). También los linfocitos B de los animales $Cdk4^{R24C/R24C}$ son más activos ya que tienen niveles superiores de CD25+ (6,97±0,9) con respecto los linfocitos de los animales $Cdk4^{+/+}$ (3,78±0,6). Sin embargo, tanto los linfocitos T como los linfocitos B de los animales $Cdk4^{R24C/+}$ y $Cdk4^{R24C/R24C}$, son más sensibles a la apoptosis como se muestra en la tabla IV.4b, donde los niveles de FAS tanto en linfocitos B (CD19+) como en los linfocitos T (CD3+), son superiores en los animales $Cdk4^{R24C/+}$ (20,58±8,1; 14,68±2) y $Cdk4^{R24C/R24C}$ (22,68±6; 13,92±1,8) con respecto a la población WT (13,26±5,04; 5,29±2,8).

a)

hembras	Linfocitos					
	CD69+ CD25+	CD19+ CD25+	CD3+ FAS+	FAS+ CD8+	CD3+ FAS+ CD25+	FAS+ CD25+
Cdk4 ^{+/+}	5,01	4,61	70,23	19,89	7,20	13,72
Cdk4 ^{+/R24C}	2,35 *	2,56 *	68,43	18,35	15,07 *	4,99 *
Cdk4 ^{R24C/R24C}	2,16 *	1,99 *	50,53 *	13,08 *	11,40 *	4,63 *

b)

machos	Linfocitos			
	CD19+ CD69+	CD19+ CD25+	CD3+ FAS+ CD25+	CD19+ FAS+
Cdk4 ^{+/+}	4,94	3,78	5,29	13,26
Cdk4 ^{+/R24C}	9,76 *	3,30	14,68 *	20,58 *
Cdk4 ^{R24C/R24C}	6,02	6,97 *	13,92 *	22,68 *

Tabla IV.4. Caracterización de los linfocitos procedentes de nódulos linfáticos pancreáticos de ratones pre-diabéticos de 6-7 semanas de edad. **a)** Linfocitos de hembras; **b)** Linfocitos de machos. * $p < 0,05$. Los resultados corresponden a un mínimo de 3 experimentos por grupo.

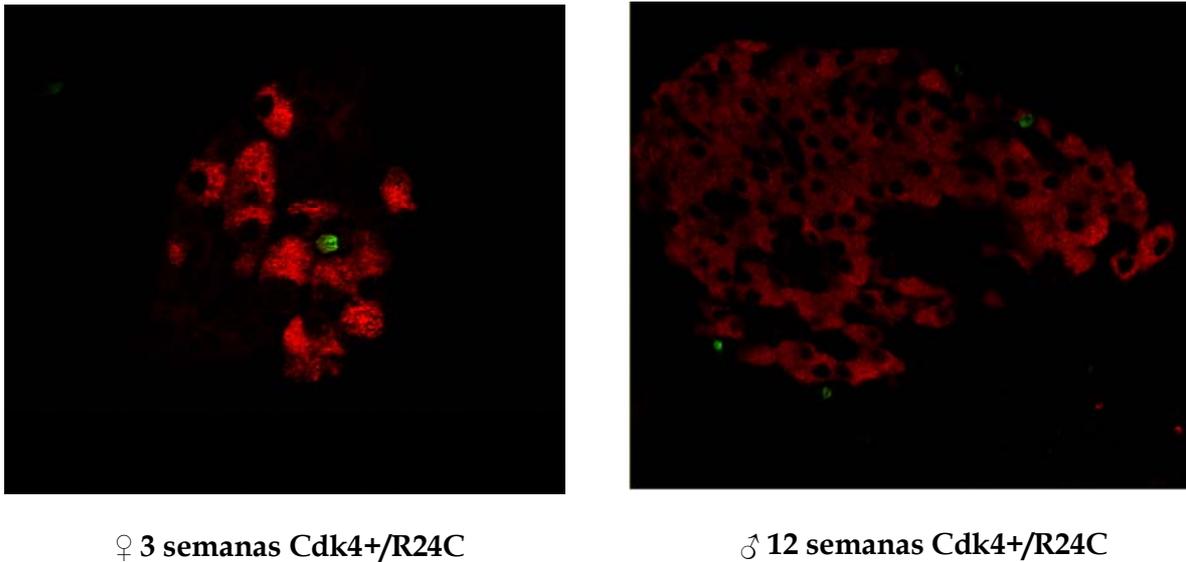
Las hembras presentan un fenotipo completamente inverso (ver tabla IV.4a). Por un lado, los animales Cdk4^{R24C/+} y Cdk4^{R24C/R24C} presentan niveles más bajos de activación (CD69+ CD25+ 2,35±1; 2,16±0,8 respectivamente) con respecto a los animales Cdk4^{+/+}(5,01±0,9), mientras que por otro lado, presentan menor susceptibilidad a la apoptosis ya que tienen niveles inferiores de FAS en los linfocitos T CD8 (13,1±2,8 de los linfocitos Cdk4^{R24C/R24C} vs. 19,9±0,4 de los linfocitos Cdk4^{+/+}), pero si estos linfocitos T están activados (CD25+) aumentan sus niveles de FAS (11,40±2 vs. 7,2±1,9) y por tanto su predisposición a la apoptosis. Por lo tanto, existe una gran diferencia entre los machos y las hembras.

B) Efecto de la mutación Cdk4R24C sobre los islotes pancreáticos

13.9 Apoptosis de los islotes pancreáticos

Se ha descrito que la diabetes puede venir mediada por el aumento de la apoptosis, que mostraría péptidos antigénicos nunca antes vistos por el sistema inmunitario [145-149].

Mediante la técnica de túnel, se realizaron ensayos de apoptosis en los islotes pancreáticos de los ratones Cdk4R24C NOD. Se midieron los niveles de apoptosis en hembras (3, 5 y 7 semanas) y en machos (7, 9 y 12 semanas). No se observaron diferencias significativas en los niveles de apoptosis de las células β (insulina +) de los islotes pancreáticos, ni tampoco en el número de islotes apoptóticos de los ratones Cdk4R24C NOD en ninguna de las condiciones.



♀ 3 semanas Cdk4+/R24C

♂ 12 semanas Cdk4+/R24C

Figura IV.20. Imagen por microscopía confocal (400X) de la apoptosis de los islotes pancreáticos. **Insulina / células apoptóticas**. Los resultados corresponden a n=3 animales por genotipo y sexo (mínimo 90 islotes por grupo experimental, procedentes de tres niveles distintos).

Por tanto la aceleración y aumento de diabetes de los ratones Cdk4^{R24C/+} y Cdk4^{R24C/R24C} no sería debido a un aumento en los niveles de apoptosis en las células que componen los islotes pancreáticos.

13.10 Transferencia adoptiva a ratones Cdk4R24C NOD/SCID

Para analizar la importancia de la mutación Cdk4R24C propiamente en la célula β para el desarrollo de la diabetes autoinmune, independientemente del efecto de dicha mutación en la población linfocitaria, se retrocruzaron ratones Cdk4R24C NOD a un fondo genético NOD/SCID, obteniendo un modelo con expresión de la mutación Cdk4R24C en el tejido pancreático pero sin la presencia de linfocitos mutados, ya que los ratones NOD/SCID carecen de ellos.

A continuación se realizaron experimentos de transferencia adoptiva de 10 millones de esplenocitos de hembras NOD Cdk4^{+/+} pre-diabéticas a hembras Cdk4R24C de los tres genotipos posibles y se estudió la incidencia acumulativa de diabetes (Figura IV.21).

La figura IV.21 muestra como las hembras receptoras con los islotes pancreáticos WT presentan una mayor incidencia acumulativa de diabetes (100%) que las hembras receptoras con los islotes con la mutación Cdk4R24C (81%). La diferencia máxima se observa entre la semana 13 y la semana 14 post-transferencia, cuando las hembras WT presentan ya una

incidencia acumulativa del 100%, mientras que la incidencia de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}NOD/SCID$ es sólo del 54,4%. Sin embargo, la aparición de los primeros casos de diabetes se produce un poco antes en la población $Cdk4^{R24C/R24C}NOD/SCID$ (6 semanas post-transferencia) que en la población $Cdk4^{+/+}NOD/SCID$ (7 semanas post-transferencia).

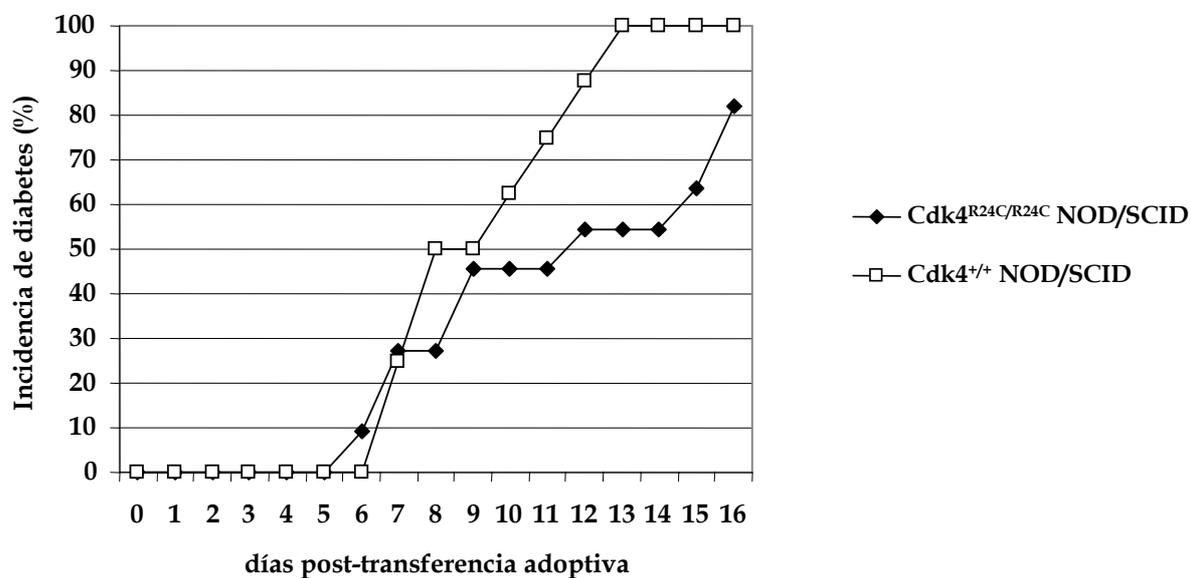


Figura IV.21. Transferencia adoptiva de esplenocitos de hembras NOD $Cdk4^{+/+}$ pre-diabéticas (6-7 semanas) a hembras $Cdk4^{R24C/R24C}NOD/SCID$ ($n=11$ $Cdk4^{R24C/R24C}NOD/SCID$ inyectadas; $n=8$ $Cdk4^{+/+}NOD/SCID$ inyectados, de un mínimo de 3 donantes por grupo experimental).

En vista de dichos resultados podemos afirmar que la hiperactividad de la $Cdk4$ compensa parcialmente el ataque autoinmune de linfocitos diabetogénicos WT, en un modelo de transferencia adoptiva. Por tanto, por un lado, la diabetes espontánea exacerbada, observada en los ratones $Cdk4^{R24C}NOD$ es debida al fenotipo altamente autoagresivo del repertorio inmunológico de estos ratones. Por otro lado, la presencia de la $Cdk4^{R24C}$ en la célula β la hace más resistente al ataque inmunológico.

13.11 Niveles de expresión de la proteína GFAP

Tras la aparición de varias publicaciones de relevancia donde se resaltaba la importancia de ciertas proteínas de origen neuronal/glial como principales desencadenantes del ataque autoinmune de la célula β [163], y del reciente hallazgo de la existencia de linfocitos B productores de anticuerpos contra dichas proteínas en infiltrados pancreáticos [168], se decidió estudiar si una de estas proteínas autoantigénicas de origen neuronal/glial, la GFAP, podría sobreexpresarse en nuestro modelo murino ocasionando la aceleración de la diabetes.

Mediante la técnica de Western Blot, se analizó la expresión de la proteína de origen glial GFAP en el páncreas de hembras $Cdk4^{+/+}$ y $Cdk4^{R24C/R24C}$ de 5 semanas de edad.

Como se observa en la figura IV.22, los niveles de expresión de la proteína GFAP en el páncreas de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ son 3,92 veces superiores a los niveles observados en los páncreas de las hembras $Cdk4^{+/+}$ de la misma edad.

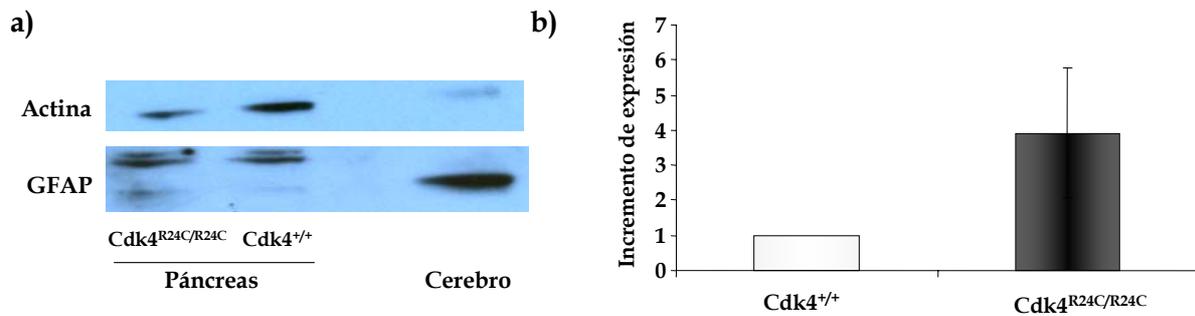


Figura IV.22. Niveles de expresión de la proteína GFAP en el páncreas de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ NOD. **a)** WesternBlot de la proteína GFAP en muestras de páncreas de ratones $Cdk4^{+/+}$ y $Cdk4^{R24C/R24C}$ de 5 semanas de edad. La muestra de proteína total de cerebro se ha usado como control positivo y la actina como proteína de expresión constitutiva (*housekeeping*) para normalizar los resultados. **b)** Incremento de la expresión de la proteína GFAP en el páncreas de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ respecto a las hembras $Cdk4^{+/+}$. Los resultados se muestran como la media de 3 experimentos independientes.

Por tanto, los niveles superiores de GFAP en el páncreas de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ pueden influir en la aceleración de la diabetes de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ observada en la historia natural (ver figura IV.23a). Además, la ligera aceleración de la diabetes observada en las hembras recipientes $Cdk4^{R24C/R24C}$ NOD/SCID puede ser debida a la elevada expresión de esta proteína en los páncreas de los animales $Cdk4^{R24C/R24C}$ NOD y que se había relacionado con la fase temprana de la reacción autoantigénica de los islotes pancreáticos durante el desarrollo de la DMT1 [169].

En resumen, el aumento de la incidencia acumulativa de diabetes observada en los ratones $Cdk4^{R24C}$ sería debida en gran medida a una mayor autoreactividad de los linfocitos debido a la mutación $Cdk4^{R24C}$ y no a una mayor sensibilidad de los islotes al ataque autoinmune debidos a la hiperplasia. La mutación $Cdk4^{R24C}$ en tejido pancreático es capaz de disminuir la incidencia acumulativa de diabetes en la cepa NOD.

14 Discusión resultados (Objetivo III)

En esta parte del trabajo, se ha mostrado que la mutación $Cdk4^{R24C}$, cuando su expresión es ubicua, provoca la aceleración de la diabetes en el modelo NOD, de forma más destacada en los machos, debido a la hiperactividad de los linfocitos y macrófagos causada por la presencia de la mutación $Cdk4^{R24C}$.

Las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ y $Cdk4^{R24C/+}$ tienen una aparición más temprana de la enfermedad comparado con las hembras $Cdk4^{+/+}$, sin embargo la incidencia acumulativa de diabetes es similar al final de la observación, dada la ya elevada incidencia acumulativa de diabetes de las hembras $Cdk4^{+/+}$ (91%). En cambio, en los machos, donde la incidencia de diabetes en los individuos $Cdk4^{+/+}$ es inferior, se aprecia claramente que la mutación $Cdk4^{R24C}$ acelera la diabetes y aumenta su incidencia acumulativa de un modo dosis-dependiente. Los datos de infiltración obtenidos muestran la existencia de una correlación positiva entre la severidad de la infiltración y la cinética de la aparición de la diabetes, corroborando que la aparición de diabetes es debida a la infiltración linfocitaria de los islotes pancreáticos.

La transferencia de esplenocitos de ratones prediabéticos de los distintos genotipos a ratones NOD/SCID confirma la hiperactividad de los esplenocitos $Cdk4^{R24C}$ y su contribución a la aceleración de la diabetes en los receptores NOD/SCID correspondientes. La inferior capacidad diabetogénica de los linfocitos $Cdk4^{+/R24C}$ de los machos podría deberse a una menor frecuencia en la población general de linfocitos autorreactivos. Tal y como se observa en el análisis de la infiltración linfocitaria, a las 7 semanas de edad los machos $Cdk4^{+/R24C}$ presentan unos niveles de insulitis ligeramente inferiores a los exhibidos por los individuos $Cdk4^{R24C/R24C}$ o $Cdk4^{+/+}$. Ello podría indicar que el grado de activación de los linfocitos autorreactivos es inferior en los ratones $Cdk4^{+/R24C}$ a las 7 semanas de edad. Si este hecho es reflejo de lo que ocurre a nivel esplénico, una vez se ha procedido a la transferencia adoptiva de dichos linfocitos cabría esperar una cinética más lenta de aparición de la enfermedad, así como una incidencia acumulativa inferior, pero no es esto lo que observamos.

Si la frecuencia de linfocitos autorreactivos fuese inferior en los ratones $Cdk4^{+/R24C}$, en los ratones $Cdk4^{R24C/R24C}$ debería ser todavía inferior a la de los $Cdk4^{+/R24C}$ y esto no sucede. Entonces se puede hipotetizar que por alguna razón la mutación R24C en los machos a las 7 semanas de edad causa una disminución en el número de linfocitos autorreactivos en la periferia, pero incrementa el grado de activación extrema de los pocos linfocitos

autorreactivos, lo cual aceleraría la aparición de la enfermedad en aquellos recipientes que hubiesen sido transferidos con alguno de los “escasos” linfocitos autorreactivos. Cuando existe una doble dosis de la mutación R24C disminuye la frecuencia de linfocitos autorreactivos, pero dicho descenso es compensado sobradamente por la replicación y activación exacerbada de éstos, como muestran los datos de proliferación basal y caracterización fenotípica, lo cual aumenta su frecuencia y ello incrementa tanto la incidencia acumulativa, como la aparición acelerada de la enfermedad

Los ensayos de proliferación in vitro muestran que los esplenocitos de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ responden de forma temprana al péptido GAD65p35. En los machos no se observan diferencias significativas en cuanto a proliferación de los esplenocitos frente a insulina o GAD65, sin embargo la proliferación basal es superior, lo cual confirma el estado hiperactivo de dichos esplenocitos. El hecho de no observar aumento de la proliferación basal de los esplenocitos de las hembras $Cdk4^{R24C}$, puede responder al hecho que en el ensayo de apoptosis frente a un estímulo de anti-CD3 se observa un aumento de apoptosis en el grupo control (sin estímulo) ya a las 16 h cultivo en los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ de hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ comparado con la apoptosis de los esplenocitos de las hembras WT o $Cdk4^{R24C/R24C}$, a esto hay que añadirle el aumento de apoptosis que se observa a las 40 h de cultivo de los linfocitos T $CD4^+$ de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ con respecto a la población de linfocitos $CD4^+$ WT.

La proliferación, ante un estímulo policlonal del co-receptor CD3, de los linfocitos de las hembras experimenta una disminución significativa en el caso de los ratones $Cdk4^{R24C/R24C}$. Mediante citometría de flujo se ha detectado una mayor presencia de CD3 en la superficie de los linfocitos T de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ que está correlacionada con un aumento de la apoptosis a las 16h de cultivo en presencia de anti-CD3 de los linfocitos T $CD8^+$ y a las 40 horas de cultivo en presencia de anti-CD3 de los linfocitos T ($CD4$ y $CD8$) de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$ con respecto a los linfocitos de las hembras $Cdk4^{+/+}$. Además, los niveles de $CD8^+$ FAS⁺ son superiores en el caso de los linfocitos de las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$. Por tanto, probablemente a las 72 horas, al añadir la timidina-³H se observa una disminución de la proliferación debido al aumento del número de células apoptóticas en las horas previas. También se observa esta disminución de la proliferación ante el estímulo policlonal anti-CD3 en el caso de los linfocitos de hembras procedentes de nódulos linfáticos. Estos resultados son consistentes con una mayor susceptibilidad a la apoptosis de los linfocitos procedentes de nódulos linfáticos en las hembras $Cdk4^{R24C/R24C}$.

La ligera proliferación superior observada en los esplenocitos de hembras frente al péptido GAD65p35 a las 6-7 semanas de edad no se observa a nivel local, lo cual indica que, debido a la recirculación de los linfocitos, la proteína GAD65 puede tener una función anterior en la cinética de la enfermedad, y desaparece como autoantígeno tardío a nivel local. Seguramente analizando los linfocitos de los nódulos linfáticos pancreáticos drenantes a una edad más temprana aparecería una respuesta a GAD65p35 también.

En el caso de los machos, por un lado se observa mayor proliferación en frente del péptido de insulina B12-25, pero por otro lado, observamos una menor proliferación frente al péptido GAD65p35 comparado con los linfocitos WT, es decir, vemos una respuesta antígeno-pancreática específica contra el péptido de la insulina B12-25, comparando con la proliferación de los esplenocitos, donde no se observa diferencia alguna. En los machos la autoinmunidad al péptido de insulina B12-25 aparece a nivel local antes y probablemente esplenocitos de animales más maduros lo muestren, debido a la recirculación de los linfocitos procedentes de los nódulos linfáticos locales a órganos como el bazo. La disminución de proliferación ante el péptido GAD65p35 puede ser debida a la disminución de la frecuencia de esta especificidad en machos.

En machos, al contrario de lo observado en hembras, no existe un incremento de la susceptibilidad a la AICD, lo cual se traduce a una mayor estimulación agonística por el anticuerpo anti-CD3 in vitro.

Comparando las respuestas proliferativas de los linfocitos entre machos y hembras, podría existir una respuesta más temprana en hembras frente a GAD65p35 que en machos, ya que a la edad analizada (6-7 semanas) en hembras, ya aparece respuesta positiva frente a GAD65p35 en bazo, mientras que en machos, a esa misma edad la respuesta es sólo a nivel local (nódulos linfáticos), contra el péptido de insulina B12-25 (ver figura IV.23a). En machos existe un paralelo entre fenotipo, proliferación in vitro y transferencia adoptiva. En hembras, parece que existe un aumento en la expresión de FAS debido a la activación que puede llevar a un incremento en la AICD, lo cual explicaría los resultados obtenidos in vitro de proliferación frente a la estimulación con anti-CD3. Quizá el menor porcentaje de linfocitos que expresan marcadores de activación en nódulos linfáticos de hembras Cdk4^{R24C}/R24C, sea debido a su inmediata eliminación por el aumento de FAS en su superficie.

La hiperactividad linfocitaria en el caso de las hembras Cdk4^{R24C}/R24C viene mediada en su mayor parte por el aumento de proliferación frente a determinados autoantígenos como el péptido GAD65p35 y el mayor estado de activación de los linfocitos CD4. Por tanto, a pesar de mostrar unos niveles inferiores de células CD4⁺ CD62L⁺ que proporcionarían a los

linfocitos un fenotipo más agresivo para el ataque autoinmune, el hecho de que los linfocitos T CD8⁺ tengan más susceptibilidad a la AICD y que los niveles de activación de las células dendríticas y de los macrófagos sean inferiores, sugiere que las APCs (linfocitos B, macrófagos y DCs) tendrían poca relevancia en el fenotipo más autoagresivo que muestran los esplenocitos transferidos a los ratones NOD/SCID, y serían los linfocitos CD4 activados (CD62L⁻) los responsables de su capacidad diabetogénica.

En el caso de los machos existe un efecto también debido a una mayor activación (niveles superiores de marcadores de activación como el CD25 o el CD69), incremento de proliferación basal (en ausencia de estímulo) y menor susceptibilidad a la padecer AICD (niveles inferiores de Fas). También los macrófagos procedentes del bazo están más activados en el caso de los machos Cdk4^{R24C/R24C} comparado con los de los machos Cdk4^{+/+}. Este aumento de la proliferación y actividad de los linfocitos por alteración en la vía Cdk4-CiclinaD-INK4-E2F-pRb ya se había observado en modelos de animales transgénicos. En el modelo Cdk4^{R24C} la familia de proteínas INK4 no pueden unirse a la Cdk4 y por tanto inhibirla. Este efecto podría asemejarse hasta cierto punto, a la ausencia de esta familia de proteínas y por tanto al fenotipo que esto ocasione. La ausencia de proteínas de la familia INK4 causa un aumento de la susceptibilidad a padecer desordenes hematopoyéticos [12]. El ratón mutante para p16INK4a (deleción del exón 1α) muestra hiper celularidad en el timo in vivo y sus esplenocitos tienen aumentado el potencial proliferativo in vitro [34]. Los linfocitos aislados del ratón deficiente en p15INK4b muestran un aumento de la respuesta proliferativa a estímulos mitogénicos [33].

Los linfocitos de los ratones NOD son resistentes a la inducción de AICD por distintos estímulos pro-apoptóticos [130]. En el caso de los machos Cdk4^{R24C/R24C} NOD, donde existe una disminución de los niveles de Fas en la superficie de los linfocitos, esta resistencia a la inducción de apoptosis afectaría también a los linfocitos autorreactivos y guardaría una relación directa con la aceleración de la enfermedad.

La alteración del islote pancreático como fuente autoantigénica está potencialmente relacionada causalmente con la incidencia de diabetes o con su aceleración. A partir de las 10 semanas de edad, los ratones NOD presentan un porcentaje de islotes grandes (megaislotes) superior al de las cepas control [187], edad a la que la masa β-celular ya está reducida en comparación con la cepa NOD/SCID, que no tiene infiltración. Paralelamente se observa un aumento de la proliferación β-celular, que sugiere una respuesta compensatoria a la continua destrucción autoinmune [141]. La relación de los megaislotes con la patogénesis de la diabetes está reforzada por varias observaciones:

- En primer lugar, los infiltrados linfocitarios se sitúan inicialmente y de forma predominante cerca de los megaislotes [187].
- En segundo lugar, la detección de los megaislotes coincide con la incidencia de diabetes [188].
- Finalmente, la prevención de la formación de megaislotes mediante el tratamiento profiláctico con insulina previene el desarrollo de la insulinitis y la diabetes en el ratón NOD [187].

Esto relacionaría de forma importante el estatus del islote, la formación de megaislotes, la infiltración linfocitaria y el desarrollo de diabetes. En el modelo Cdk4^{R24C} CD1/129^{Sv} observamos también un tamaño de islotes superior y que probablemente se mantenga en cierta medida en el fondo genético NOD, hay que tener en cuenta que en el fondo genético NOD los islotes sufren una reducción debido al ataque autoinmune. Este engrandecimiento de los islotes podría acelerar también la aparición de la diabetes en nuestro modelo.

La presencia de niveles superiores de la proteína GFAP en el páncreas del modelo Cdk4^{R24C/R24C} NOD, también puede tener relación con la aceleración de la diabetes observada en este modelo. Se han relacionado las proteínas de origen neuroendocrino presentes en el páncreas con las fases tempranas del desarrollo de la diabetes [167-169, 189].

En el modelo Cdk4^{R24C} NOD/SCID, donde se elude el efecto causado por los linfocitos mutados, se observa una disminución de la incidencia de diabetes al transferir linfocitos diabetogénicos de animales prediabéticos. Este hecho podría explicarse por la mayor proliferación de la célula β -pancreática, que sumada a la que existe durante etapas iniciales de la destrucción autoinmune, produciría una compensación de la destrucción de la célula β disminuyendo los casos de diabetes. Por tanto, el fenotipo del modelo Cdk4^{R24C} no apoyaría la teoría del megaislote como estimulador de la autodestrucción. Sin embargo, el hecho de tener un aumento de los niveles de GFAP en páncreas sí que podría traducirse en la aparición ligeramente más temprana de la diabetes que se observa en la transferencia adoptiva de linfocitos a ratones Cdk4^{R24C/R24C} NOD/SCID comparado con la transferencia a receptores NOD/SCID WT, pero que se vería compensada por la mayor proliferación, disminuyendo incluso los casos de diabetes.

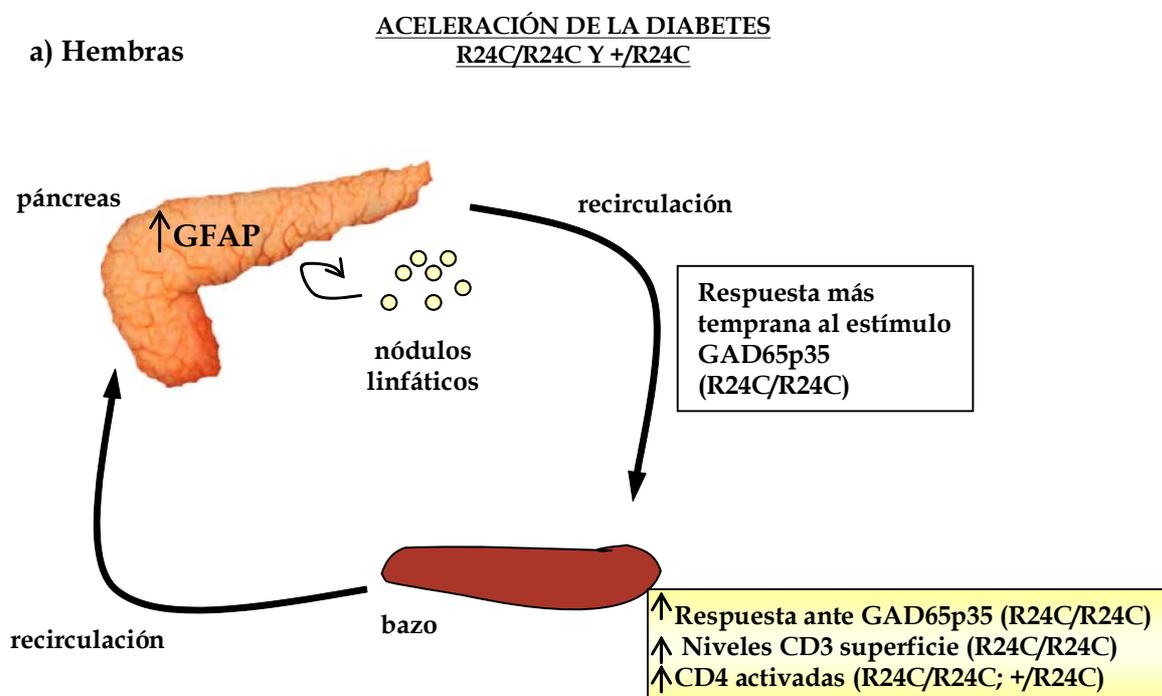
En resumen, la mutación Cdk4^{R24C} de expresión ubicua causa la aceleración de la diabetes en ratones NOD debido la hiperactividad linfocitaria exhibida, sin embargo la ausencia de la mutación R24C en la población linfocitaria preservando su presencia en la célula β , previene la aparición de la enfermedad.

El aumento de la prevalencia de la DMT1 ha hecho aumentar los esfuerzos dedicados al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la obtención de una fuente de masa β -celular ilimitada. La regeneración de la masa de célula β propia es uno de los principales objetivos en la cura de la diabetes autoinmune [84].

A modo de modelo, proponemos una explicación del aumento de incidencia y/o aceleración de diabetes en los ratones Cdk4 R24C NOD.

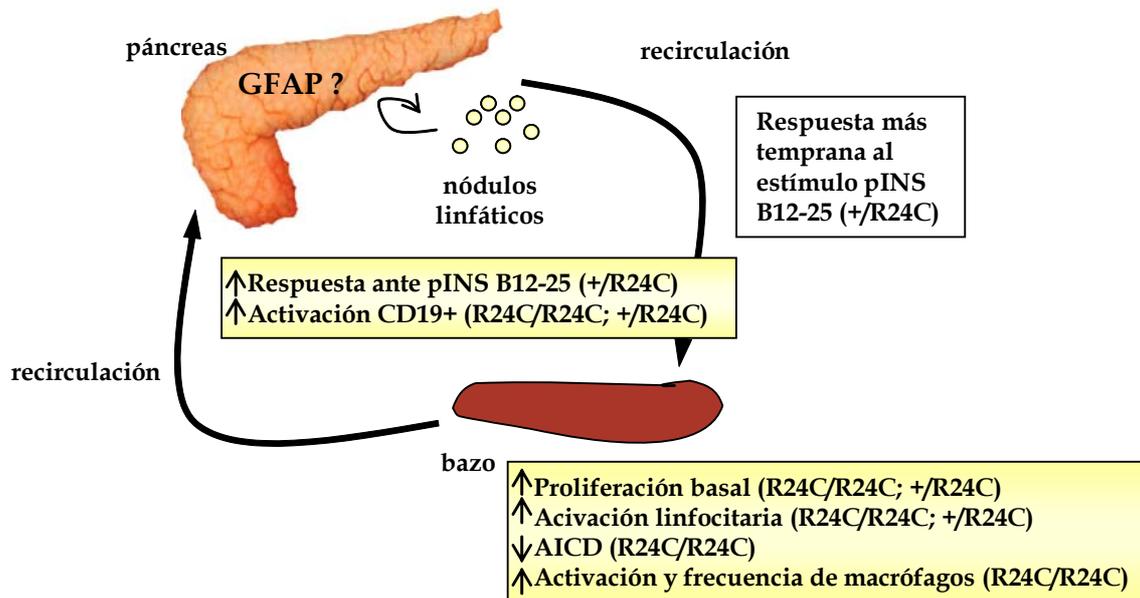
a) Las hembras Cdk4R24C presentan una respuesta más temprana al péptido GAD65p35, que se traduce en un aumento de proliferación de los esplenocitos frente a este péptido a las 6-7 semanas de edad, los linfocitos CD4⁺ de bazo están más activados y presentan unos niveles superiores de CD3, que probablemente induce una mayor proliferación. A nivel de páncreas, los niveles superiores de proteína GFAP a las 5 semanas de edad pueden estar ocasionando la aparición más temprana de la enfermedad.

b) Los machos Cdk4R24C presentan en bazo unos linfocitos con una proliferación basal y activación superior. Los macrófagos están presentes en mayor número y más activados. Además, la susceptibilidad a la apoptosis es inferior. A nivel de nódulos linfáticos, la temprana respuesta al péptido INS B12-25 y la mayor activación de los linfocitos B, son factores que apoyarían la aceleración y mayor incidencia de diabetes observada.



b) Machos

ACELERACIÓN DE LA DIABETES RATONES Cdk4 R24C/R24C
AUMENTO INCIDENCIA RATONES R24C/R24C Y +/R24C



15 Resumen final de los resultados

- 1 Los ratones Cdk4R24C CD1/129 presentan una hiperplasia β pancreática.
- 2 La hiperplasia de la célula β pancreática no provoca cambios ni en la glicemia ni en la insulinemia de los ratones Cdk4R24C CD1/129Sv.
- 3 La mutación Cdk4R24C en un background CD1/129Sv no provoca cambios fisiológicos destacables (biosíntesis y conversión de proinsulina a insulina y oxidación/utilización de glucosa) en la célula β , a pesar de la hiperplasia pancreática que provoca.
- 4 Los ratones Cdk4R24C CD1/129 tienen un retorno más rápido a los niveles basales de glicemia después de un estímulo intraperitoneal de glucosa, debido a una mayor secreción de insulina.
- 5 Los islotes humanos infectados con vectores lentivirales portadores de la mutación Cdk4R24C tienen una mayor proliferación, y esta proliferación es debida al aumento de proliferación de la célula β .
- 6 La mutación Cdk4R24C en un fondo genético de susceptibilidad a padecer DMT1 (NOD), provoca una aceleración de la diabetes tanto en los machos como en las hembras Cdk4R24C NOD y un aumento de incidencia de la enfermedad en los machos.
- 7 La aceleración y aumento de la incidencia en machos es debida a la mayor proliferación de los linfocitos procedentes de nódulos linfáticos frente al péptido de insulina B12-25, una mayor activación de los esplenocitos, un aumento de la proliferación basal de los esplenocitos y una disminución de la susceptibilidad a la apoptosis.
- 8 La aceleración de la diabetes en hembras es debida a una proliferación superior de los esplenocitos frente al péptido GAD p65, unos niveles superior de CD3 en su superficie y un aumento de los niveles de la proteína GFAP en el páncreas de las hembras Cdk4^{R24C}/R24C.
- 9 En el modelo Cdk4R24C NOD/SCID, con ausencia de linfocitos T y B, la mutación R24C disminuye la incidencia de diabetes, pero no retrasa su aparición.