

DIABETIS AVUI



VISIÓ GLOBAL DE L'AUTOIMMUNITAT A LA DIABETIS TIPUS 1: L'ESCENARI PANCREÀTIC

Marta Vives-Pi

Laboratori d'Immunologia i Diagnòstic Molecular (LIRAD-BST)

Institut de Recerca Germans Trias i Pujol



Institut de Recerca Germans Trias i Pujol

Carretera del Canyet s/n

08916 Badalona



telèfon 93.4978666



93.4978669



mvives.liradbst.germanstrias@gencat.cat

1. Introducció.

La diabetis mellitus tipus 1 (DT1) és una malaltia causada per la destrucció de les cèl·lules β del pàncrees, productores d'insulina. En la classificació de la diabetis mellitus proposada el 1997 pel Comitè d'Experts de la Associació Americana de Diabetis (ADA), es distingeix entre la diabetis tipus 1A, immunomediada, i la diabetis tipus 1B, idiopàtica [1]. La diabetis tipus 1A està causada per una destrucció de les cèl·lules β per part del sistema immunitari. La diabetis tipus 1B és d'etiologia desconeguda i sense evidències d'autoimmunitat. No obstant, en literatura habitualment es fa referència a DT1 per denominar la diabetis autoimmunitària que se sol diagnosticar durant la infància o l'adolescència, tot i que també pot aparèixer en l'edat adulta. Les primeres manifestacions clíniques (hiperglicèmia, glucosúria, polidípsia, poliúria, polifàgia, pèrdua de pes i cetoacidosi) apareixen després d'un període asimptomàtic (pre-diabetis) durant el qual progressa la resposta autoimmunitària contra les cèl·lules β . Per confirmar el diagnòstic de DT1 es valora la presència d'autoanticossos, marcadors d'autoimmunitat, contra cèl·lules dels illots (ICA), anti-glutamat descaboxilasa o GAD (GADA), anti-insulina (IAA) i anti proteïna tirosina fosfatasa IA-2 (IA-2A).

L' etiologia d'aquesta malaltia és desconeguda i quan es diagnostica ja s'han destruït el 80-95% de cèl·lules β [1]. Això fa que els fenòmens autoimmunitaris inicials no es detectin. El difícil accés al pàncrees –és un òrgan on no es fan biòpsies- tampoc facilita obtenir els coneixements sobre els fenòmens immunològics que tenen lloc a l'òrgan diana de la diabetis. El que se sap fins ara, es basa en uns pocs casos de de pacients diabètics que han mort en diferents etapes de la malaltia (necròpsies i autòpsies) i en l'estudi de certs models animals que reproduïxen la DT1 humana. Aquests estudis són l'actual font de coneixement per comprendre els fenòmens que comporta la pèrdua de tolerància immunològica contra components propis *in situ*.

2. L'autoimmunitat i els autoantgens a la DT1.

En alguns individus el sistema immunitari perd la capacitat de distingir entre components propis i no propis i pot causar dany als teixits de l'individu. L'autoimmunitat és la resposta immunitària contra antígens propis i, si hi ha conseqüències, es presenten les malalties autoimmunitàries. Aquesta resposta està

mediada per un component cel·lular (principalment limfòcits T) i un component humoral (autoanticossos), que reflecteixen l'etiologia autoimmunitària. Això ho corrobora la millora de pacients amb autoimmunitat tractats amb immunosupressors, com la ciclosporina [2]. La transferència de la DT1 a través de limfòcits ha estat clarament demostrada en ratolins i en humans, on es va reportar la transmissió de la malaltia entre dos germans amb HLA idèntic després d'un transplantament de medulla òssia [3]. Sovint es manifesten varies malalties autoimmunitàries en un mateix individu o família, per susceptibilitat genètica lligada a HLA i a altres regions. Els pacients amb DT1 desenvolupen amb major freqüència tiroiditis autoimmunitària, celiaquia, malaltia d'Addison o síndrome poliglandular autoimmunitària [4].

L'atac autoimmunitari es dona contra certs components de l'òrgan diana anomenats autoantígens, que en el cas de la DT1 són molècules dels illots pancreàtics. En el procés immunoregulator de l'autoimmunitat actuarien les cèl·lules T reguladores (Tregs), tant als òrgans limfoides secundaris com al teixit diana, però en pacients amb DT1, aquestes cèl·lules podrien tenir alterada la seva capacitat supressora [5]. Alguns d'aquests autoantígens, com insulina o IGRP, són exclusius de cèl·lules β però d'altres no ho són, com els neuroendocrins (GAD, IA-2, S100 β) o neuronals (GFAP) [6]. A la DT1 es detecten autoanticossos contra antígens insulars que es consideren marcadors de la destrucció de les cèl·lules β i de risc de desenvolupar la malaltia, més que un mecanisme efector. Els autoanticossos anti-insulina (IAA) són els primers en aparèixer, i la seva prevalença és inversament proporcional a l'edat d'inici clínic [7]. Els autoanticossos anti-GAD (GAD₆₅A) són un bon marcador d'autoimmunitat contra els illots en adults, amb una prevalença del 84% mentre que els anti-IA-2 (IA-2A) tenen una prevalença del 70% [7]. Recentment s'han identificat autoanticossos contra el transportador de zinc ZnT8 en el 60-80% de pacients amb DT1 [8].

3. El pàncrees a la diabetis humana: noves eines d'estudi.

Afortunadament la DT1 no sol ser una causa de mortalitat directa i per això hi ha pocs casos de mostres de pàncrees de pacients obtingudes, especialment a l'inici clínic de la malaltia. La fase pre-diabètica, assintomàtica, no sol ser detectada, però probablement és la més interessant des del punt de vista immunològic. Les biòpsies pancreàtiques no es practiquen degut al risc de pancreatitis, amb l'excepció del Japó [9]. Alguns grups han realitzat estudis histològics de mostres obtingudes puntualment, revelant manifestacions de la resposta autoimmunitària als illots pancreàtics [10].

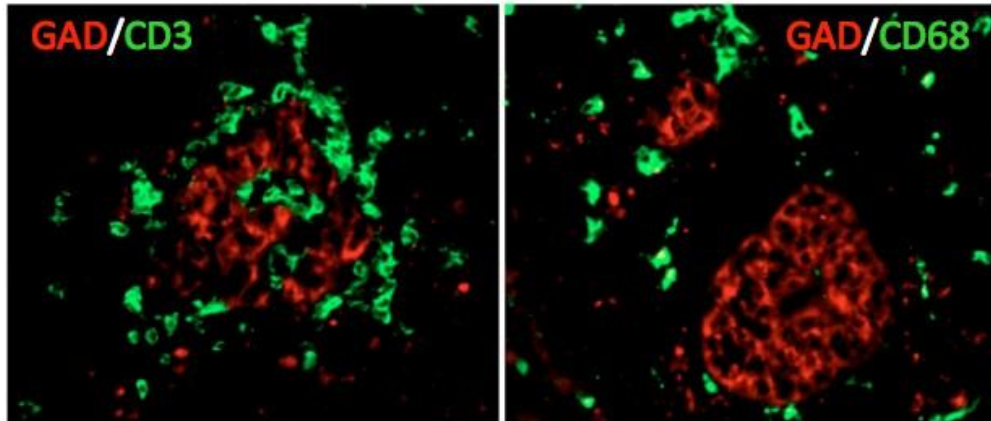


Figura 1. Leucòcits infiltrants del pàncrees en pacients amb DT1. Imatges d'illots pancreàtics d'una pacient amb DT1 al moment del diagnòstic clínic de la malaltia. Els illots marcats amb GAD (vermell) mostren la presència d'insulitis (verd) formada per limfòcits T CD3⁺ (esquerra) i macròfags CD68⁺ (dreta).

En els casos estudiats hi ha una lleugera infiltració leucocitària dels illots formada majoritàriament per limfòcits T citotòxics (CD8⁺) i macròfags [11-15], (**Figura 1**). També hi ha presència de limfòcits T CD4⁺, limfòcits B i cèl.lules dendrítiques. Com és d'esperar, s'observa una disminució important d'expressió d'autoantígens com GAD i insulina degut a la desaparició de la població β [11, 13]. Les cèl.lules endocrines sobreexpressen les molècules de presentació antigènica HLA de classe I [11-15], i ocasionalment HLA de classe II [11, 12, 14, 16]. Als illots pancreàtics i endotelis s'ha observat una sobreexpressió de molècules d'adhesió (ICAM-1, VLA), citocines proinflamàtiques i interferó així com de la molècula de mort programada Fas -a les cèl.lules endocrines- i de lligand de Fas -als leucòcits infiltrants- [17] (**Taula 1**):

Taula 1. Alteracions immunològiques als pàncrees de pacients amb DT1

ALTERACIÓ	LOCALITZACIÓ
Insulitis amb predominància de limfòcits TCD8 ⁺	Illots i perifèria insular
Insulitis amb predominància de cèl.lules NK	Illots positius per la proteïna enteroviral vp1
Sobreexpressió de HLA de classe I	Illots
Marcatge positiu per la proteïna enteroviral vp1	Cèl.lules β
Expressió ectòpica de HLA de classe II	Illots, cèl.lules ductals
Sobreexpressió de molècules d'adhesió	Illots i endotelis
Sobreexpressió de TAP-1	Illots

Dipòsits d'anticossos IgG fixadors de complement	Illots i perifèria insular
Pèrdua de l'expressió d'autoantígens	Cèl.lules β
Presència de perforina	Pàncrees
Expressió de Fas	Cèl.lules α i β
Expressió de lligand de Fas	Leucòcits infiltrants
Expressió de citocines: IFN- γ , IFN- α , IFN- β i IL-6	Pàncrees, limfòcits (IFN- γ)
Expressió de citocines: TNF- α i IL-1 β	Macròfags, cèl.lules dendrítiques

Recentment i degut a les noves tecnologies és possible descriure els processos destructius i de regeneració dels illots pancreàtics durant la diabetogènesi. La metodologia de *microarrays* permet quantificar desenes de milers de trànscrips d'una mostra en un sol experiment [18]. Aquesta tècnica consisteix en la hibridació de RNA d'una mostra marcat amb fluorocroms en un suport sòlid, que conté milers de sondes de DNA. Cada trànscrip s'uneix amb la seva sonda complementària. Per tant, es pot quantificar l'abundància d'un trànscrip en una mostra segons el nivell de fluorescència. Aquesta metodologia genera milers de dades a cada experiment que es processen amb eines de bioestadística i bioinformàtica. Les dades resultants, anomenades *transcriptoma*, emmagatzemades en bases de dades d'expressió gènica s'analitzen segons les ontologies dels gens amb expressió diferencial i s'integren en xarxes i vies de senyalització. Les anàlisis de transcriptomes han definit les alteracions associades a diverses malalties autoimmunitaries, incloent la DT1. Algunes d'aquestes alteracions són comuns en diferents malalties autoimmunitaries, tant en teixits perifèrics (sang, leucòcits de sang perifèrica, òrgans linfoïdes etc) com en l'òrgan diana.

Les variacions transcripcionals dels teixits perifèrics ofereixen informació sobre els processos sistèmics de la malaltia i possibles biomarcadors pel diagnòstic i seguiment de la malaltia. A més tenen l'avantatge que els teixits solen ser més fàcils d'obtenir que els òrgans diana. Malgrat això, no són un reflex totalment acurat dels fenòmens que tenen lloc al teixit atacat per la resposta autoimmunitària.

4. Visió global de les alteracions al pàncrees a la DT1.

Els estudis puntuals realitzats en pàncrees de pacients diabètics són de gran importància en la comprensió dels fenòmens destructius de la cèl.lula β , però no ofereixen una visió global del desenvolupament de l'atac autoimmunitari.

El model experimental més utilitzat per a l'estudi de la DT1 és el ratolí NOD (Non Obese Diabetic) [19], que desenvolupa una diabetis autoimmunitària similar a la humana i que ha estat el sustrat de microarrays per determinar els perfils d'expressió gènica en diferents estadiis de la malaltia [20-22]. Les dades obtingudes són una gran contribució a l'estudi de la DT1 però cal no perdre de vista les diferències existents entre el sistema immunitari d'un ratolí i d'un humà [23] així com entre la diabetis humana i la murina [24]. També molt rellevants són els estudis d'anàlisi de microarrays amb illots cultivats in vitro simulant les condicions diabetogèniques [25]. Tot i això, per definir les alteracions funcionals en el òrgan diana de la DT1, el sustrat ideal fóra els pàncrees i els illots de Langerhans d'individus pre-diabètics i diabètics en diferents etapes d'evolució de la malaltia.

Recentment s'ha generat la primera base de dades de l'expressió gènica de pàncrees i illots purificats procedents de pacients amb DT1 [26]. L' estudi analitza el transcriptoma de l'òrgan diana de quatre pacients en diferents estadis de progressió de la malaltia: moment del diagnòstic, inici clínic recent (9 mesos), i llarga evolució (8 i 10 anys). Els perfils d'expressió gènica es van estudiar també als illots purificats de dos d'aquests pacients, establint-se una comparació entre el teixit endocrí (1% del pàncrees) i la glàndula total. Tot i tractar-se d'una serie petita, els quatre pacients eren típics casos de DT1 tant des del punt de vista clínic com immunològic i els resultats mostraven una clara concordància entre tots. Caldria estendre aquests estudis a més casos tant diabètics com prediabètics, però com ja s'ha comentat, tant l'accés al pàncrees com la identificació d'individus prediabètics és molt complicat. Una iniciativa de la Juvenile Diabetes Foundation té l'objectiu d'aconseguir i distribuir teixits de pacients i d'individus pre-diabètics (amb autoanticossos) per ampliar els estudis relacionats amb el desenvolupament de la DT1 (www.jdrfnpod.org).

L'estudi en profunditat del transcriptoma dels pàncrees de pacients diabètics revela que el procés autoimmunitari és d'una complexitat més gran del que previament s'havia postulat i s'observa desde l'inici fins a fases cròniques de la malaltia. En general, al pàncrees sencer, la majoria dels gens amb expressió diferencial es troben hiperexpressats (80-97%) probablement degut a l'increment de l'expressió dels gens de la resposta autoimmunitària. En canvi, als illots, la majoria dels gens diferencialment expressats es troben amb expressió disminuïda (64% i 82%) degut a la gairebé total desaparició de la població de cèl.lules productores d'insulina (**Taula 2**).

Taula 2. Gens diferencialment expressats (D.E.) als pàncrees (P) i illots (I) de pacients amb DT1. En vermell gens hiperexpressats, en verd gens amb expressió disminuïda. Evolució DT1: d, dies; m, mesos; a, anys.

CAS	P					I		
	1	2	3	4	Comuns	1	4	Comuns
EVOLUCIÓ DT1	5 d	9 m	8 a	10 a		5 d	10 a	
GENS D.E.	851	1058	1444	635	149	902	975	423
é □	92%	95%	80%	97%	98%	36%	18%	15%
ê □	8%	5%	20%	3%	2%	64%	82%	85%

Les vies funcionals alterades confirmen la contribució de gens de les diverses categories de la resposta immunitària, previament identificats en els estudis immunohistològics. Destaquem:

- Presentació antigènica, endògena i exògena: HLA de classe I i II, transportadors de pèptids, subunitats del proteasoma, cadena invariant i catepsina.
- Subpoblacions leucocitàries: Molècules de limfòcits B, T, macròfags i cèl.lules dendrítiques.
- Molècules d'adhesió: VCAM, CD36, CD44 i CD47.

Però com a novetat, s'han identificat noves vies funcionals que presenten expressió diferencial a la DT1, i que no havien estat definides fins el moment present.

Destaquem l'augment de les relacionades amb els següents processos:

- Quimiotaxis: Quimiocines atraients de neutròfils (CXCL1, CXCL6, IL8), monòcits i cèl.lules T activades (CCL2, CCL3, CCL4) i quimiorepulsors (CXCL12 en els illots, en un intent de protecció en front la insulinitis).
- Inflamació i immunitat innata: Proteïnes de fase aguda (CRP, FGG) i defensa antimicrobiana (receptors de reconeixement de patògens: LYZ, CD14, TLR1, TLR3).
- Immunoglobulines: Gens de immunoglobulines que revelen la presència de limfòcits B a l'infiltrat.
- Complement: hiperexpressió del sistema complement, tant de molècules efectores com reguladores i inhibidores. Aquest fet pot reflectir l'activitat dels macròfags de la insulinitis, la població leucocitària més productora de complement.
- Resposta a IFN: hiperexpressió de gens de resposta a interferó, tot i que l'anàlisi no discrimina entre quins són d'IFN de tipus I (antivirals) i IL1/IFN.
- Immunoregulació i reparació: Gran nombre de gens hiperexpressats i relacionats amb vies inhibidores de la resposta immunitària com ara HLA no

clàssic, família B7, TGF-beta, gens de regeneració (REG) i gens associats a cèl.lules troncales (prominina 1, nestina, CD133).

Aquestes novetats, sorprenentment, eren molt més evidents al pàncrees total que als illots purificats suggerint la implicació del teixit exocrí en el procés. Pel que fa als illots, l'estudi demostra per primera vegada la presència de transcrits de gens d'immunoglobulines, immunitat natural, presentació antigènica i quimiotaxi. Com és d'esperar, hi ha una devallada en l'expressió de gens de cèl.lula β (insulina, GAD, IGRP, IAPP, PP), però també de molts gens del sistema nerviós, la majoria específics de neurona. Aquest resultat, recolza el paper dels autoantígens de sistema nerviós en la DT1, un fet ja demostrat en estudis en ratolins [6, 27]. Per contra, els illots dels pacients amb DT1 tenen hiperexpressió de gens de regeneració, probablement com a conseqüència de l'intent de restaurar el nombre de cèl.lules β . Paral·lelament, el teixit exocrí mostra una reducció en transcrits d'enzims digestius al diagnòstic de la malaltia, juntament amb un augment de factors inflamatoris i immunològics.

En els casos de llarga evolució de la malaltia s'observa clarament un transcriptoma alterat, amb una resposta autoimmunitària molt activa fins i tot 10 anys després de l'inici clínic de la malaltia. En aquests casos hi ha hiperexpressió de gens de resposta immunitària innata i inflamació per una banda, i intentant reparar l'atac, hiperexpressió de gens de regeneració i immunoregulació. La balança es decanta però cap a la destrucció, tot i que es van produïnt noves cèl.lules β durant tot el procés [28]. Les noves cèl.lules β representarien una nova font d'autoantígens que retroalimentaria la resposta i cronificaria l'autoimmunitat. Aquest perfil encaixa bé amb la hipòtesi que postula que la DT1 seria conseqüència d'un procés remitent-recurrent en el microambient insular [29] i contradiu el concepte previ segons el que l'autoimmunitat era un procés agut que finalitza un cop destruïdes les cèl.lules productores d'insulina.

Un altre aspecte important és l'estudi de la presència de virus en els pàncrees dels pacients. En aquest estudi de transcriptoma, no es va trobar evidència directa de presència d'infecció viral [11]. Les evidències indirectes o emprentes virals poden ser difícils de detectar després de l'inici clínic de la malaltia probablement degut a una llarg temps entre la infecció i els símptomes clínics de la diabetis. De fet, un estudi previ demostra la presència de l'enterovirus Cxsackie B4 en el pàncrees de tres de sis pacients amb DT1 [30]. Algunes alteracions en el perfil d'expressió gènica observades concordarien amb la possibilitat d'una infecció vírica en els illots: l'augment d'expressió de gens de citocines de resposta antiviral (IFN de tipus 1 i IL-6), de gens d'immunitat natural i de resposta a IFN. Gens concrets hiperexpressats en els pàncrees de DT1 i relacionats amb infecció vírica són: MX-1 (proteïna de la resistència al myxovirus) i

HLA-G [31]. Malgrat això, els efectes causals directes són difícils de verificar i caldrien estudis més profunds i amb més mostres que, de verificar-se, contribuïrien al disseny d'estratègies preventives de la malaltia.

En resum, l'estudi de l'expressió gènica en el teixit diana de quatre pacients amb DT1 revela un procés autoimmunitari complex, cronificat i amb cert grau d'heterogeneïtat.

5. Transcriptoma a la DT1: punts en comú amb altres malalties autoimmunitàries.

L'aplicació dels microarrays a l'estudi de diverses malalties autoimmunitàries, ha permès identificar diferències i similituds en vies funcionals alterades en els òrgans diana. Una de les alteracions més comú és la 'signatura d'IFN' en sang perifèrica d'individus pre-diabètics [32] de pacients amb Lupus i amb malaltia de Sjögren's. Pel que fa a l'òrgan diana, s'ha definit el transcriptoma a diverses malalties, entre d'altres DT1 [26], tiroiditis [33, 34] artritis reumatoide [35], esclerosi múltiple [36] i celiàquia [37]. Les alteracions transcripcionals en totes elles afecten a la resposta immunitària amb alguns perfils hiperexpressats comuns [38] com per exemple la resposta a IFN, la presentació antigènica (HLA), les molècules d'adhesió, les immunoglobulines, els limfòcits T, la signatura de IL-1, IL-6 i IL-17, les quimiocines i el sistema complement. Globalment aquests resultats indiquen un augment en l'expressió dels gens de resposta immunitària a l'òrgan o teixit afectat, com a conseqüència d'una errada en els mecanismes de control de la tolerància perifèrica. Els mecanismes de regulació i regeneració es posen en marxa en el teixit, però són insuficients per una reparació total donada la persistència de l'autoantigen, i el procés es cronifica. Una excepció seria la celiàquia, on l'eliminació del gluten de la dieta fa que es normalitzin les vies alterades en el budell prim [39] i que es regenerin les parets intestinals.

També s'han identificat diferències entre DT1 i altres malalties, que indiquen processos específics de cada atac, influenciats per factors genètics i ambientals. Per exemple, en el cas de l'esclerosi múltiple hi ha un augment de transcrits de IL-6, IL-17 i IFN-gamma. Les glàndules tiroïdals de pacients amb tiroiditis de Hashimoto o de Graves' presenten una alta transcripció de gens de proteases involucrades a la degradació de la matriu extracel·lular i també de gens de limfòcits com a conseqüència dels folicles linfoïdes ectòpics [40]. En celiàquia hi ha molts gens hiperexpressats d'activació de limfòcits T, de maduració B i de diferenciació de cèl·lula epitelial com a reflexe de l'actiu procés destructiu que afecta una gran àrea tissular. Apart d'explicar

algunes diferències clíniques, aquestes característiques pròpies de cada teixit diana constitueixen una font de potencials biomarcadors pel diagnòstic i seguiment de les malalties i també de possibles molècules diana per futures estratègies terapèutiques.

L'escenari es podria resumir en tres fronts: 1) factors de resposta inflamàtoria i immunitat innata sintetitzats pel teixit atacat; 2) limfòcits autoreactius que estableixen la resposta específica d'atac i amplifiquen la resposta inflamatòria; 3) mecanismes per contrarestar l'autoimmunitat com l'eliminació de cèl.lules apoptòtiques, la regeneració, les cèl.lules tolerogèniques i els factors immunoreguladors.

6. Conclusions.

Malgrat l'interès i els esforços en el coneixement de les causes de la pèrdua de tolerància immunològica cap a les cèl.lules β , l'etiologia de la DT1 segueix essent desconeguda. Els models animals han estat importants eines per l'estudi de la malaltia, així com les extrapolacions de les condicions diabetogèniques en condicions *in vitro*. La nova tecnologia desenvolupada als anys 90 ha contribuït a la identificació dels perfils d'expressió gènica en diverses malalties oferint una visió global molecular. En el cas de la DT1 s'han generat grans quantitats de dades, majoritàriament utilitzant el ratolí NOD i la sang perifèrica de pacients diabètics com a substrat. Recentment també s'ha determinat el primer transcriptoma humà de pàncrees i illots de pacients amb DT1. Amb les dades de tots aquests estudis, i dels estudis immunohistològics clàssics reportats des dels anys 60, podem elaborar un mapa més precís de les alteracions causa-efecte de l'autoimmunitat en el pàncrees: resposta inflamatòria, immunitat innata i autoimmunitat activa en pacients amb llarga evolució de la malaltia. Caldria disposar de la mateixa informació en pàncrees d'individus prediabètics, en diferents moments crítics de la història natural de la malaltia: 1) inici de la pèrdua de tolerància immunològica cap a la cèl.lula β ; 2) aparició dels autoanticossos com a biomarcadors de destrucció; 3) devallada de la massa β i 3) diagnòstic clínic. De poder fer-se un seguiment d'aquest tipus, se sabrien els factors determinants en cada moment i també si hi ha individus que superen l'autoimmunitat i la reverteixen mitjançant un re-establiment natural de la tolerància perifèrica, evitant la malaltia.

Finalment, la identificació de gens implicats en l'inici, progressió i regeneració a la DT1 en el teixit diana podrien contribuir al disseny d'immunoteràpies per frenar la resposta autoimmunitària facilitant l'èxit de la medicina regenerativa en la DT1.

7. Bibliografia.

- ¹ Atkinson MA, Maclaren NK 1994 The pathogenesis of insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 331:1428-1436
- ² Feutren G, Mihatsch MJ 1992 Risk factors for cyclosporine-induced nephropathy in patients with autoimmune diseases. International kidney biopsy registry of cyclosporine in autoimmune diseases. *N Engl J Med* 326:1693-1695
- ³ Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K, Schaefer UW, Wernet P, Bertrams J, Grosse-Wilde H, Gries FA, Kolb H 1993 Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet* 341:1243-1244
- ⁴ Barker JM 2006 Type 1 diabetes associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1210-1217
- ⁵ Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI 2005 Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 54: 92-99
- ⁶ Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, Sampson A, Afifiyan F, Elford A, Jackowski G, Becker DJ, Santamaria P, Ohashi P, Dosch HM 2003 Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* 9:198-205
- ⁷ Tsirogianni A, Pipi E, Soufleros K 2009 Specificity of islet cell autoantibodies and coexistence with other organ specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus. *Autoimm Rev* 8:687-691
- ⁸ Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC 2007 The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *PROC NATL ACAD SCI USA*, 2007. 104:17040-17045
- ⁹ Imagawa A, Hanafusa T, Tamura S, Moriwaki M, Itoh N, Yamamoto K, Iwahashi H, Yamagata K, Waguri M, Nanmo T, Uno S, Nakajima H, Namba M, Kawata S, Miyagawa JI, Matsuzawa Y 2001 Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes. *Diabetes* 50:1269-1273
- ¹⁰ Foulis AK 1996 The pathology of the endocrine pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *APMIS* 104:161-167
- ¹¹ N. Somoza, F. Vargas, C. Roura-Mir, M. Vives-Pi, M.T. Fernández-Figueras, A. Ariza, R. Gomis, R. Bragado, M. Martí, D. Jaraquemada, R. Pujol-Borrell 1994 Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus: changes in HLA,

adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V β usage, and cytokine profile. *J Immunol* 153:1360-1377

¹² Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR 1985 In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med* 313:353-360

¹³ Hänninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O 1992 Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 90:1901-1910

¹⁴ Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa A, Tamura S, Inada M, et al 1993 Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest* 92:2313-2322

¹⁵ Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG 2008 Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 155: 173-181

¹⁶ Foulis AK, Farquharson MA 1986 Aberrant expression of HLA-DR antigens by insulin-containing beta-cells in recent-onset type 1 diabetes mellitus. *Diabetes* 35:1215-1224

¹⁷ Moriwaki M, Itoh N, Miyagawa J, Yamamoto K, Imagawa A, Yamagata K, Iwahashi H, Nakajima H, Namba M, Nagata S, Hanafusa T, Matsuzawa Y 1999 Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 42:1332-1340

¹⁸ Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL 1996 Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14: 1675-1680

¹⁹ Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y 1980 Breeding of a non-obese diabetic strain of mice. *Exp Anim* 29:1-13

²⁰ Aspod C, Rome S, Thivolet C 2004 Early events in islets and pancreatic lymph nodes in autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 23:27-35

²¹ Matos M, Park R, Mathis D, Benoist C 2004 Progression to islet destruction in a cyclophosphamide-induced transgenic model: a microarray overview. *Diabetes* 53:2310-2321

²² Vukkadapu SS, Belli JM, Ishii K, Jegga AG, Hutton JJ, Aronow BJ, Katz JD 2005 Dynamic interaction between T cell-mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse. *Physiol Genomics* 21:201-211

²³ Mestas J, Hughes CC 2004 Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172:2731-2738

- ²⁴ von Herrath MG, Nepom GT 2009 Remodeling rodent models to mimic human type 1 diabetes. *Eur J Immunol* 39:2049-2054
- ²⁵ Ortis F, Naamane N, Flamez D, Ladrière L, Moore F, Cunha DA Colli ML, Thykjaer T, Thorsen K, Orntoft TF, Eizirik DL 2010 Cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary beta-cells. *Diabetes* 59:358-374
- ²⁶ Planas R, Carrillo J, Sanchez A, de Villa MC, Nuñez F, Verdaguer J James RF, Pujol-Borrell R, Vives-Pi M 2010 Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in long-standing diabetes. *Clin Exp Immunol* 159:23-44
- ²⁷ Carrillo J, Puertas MC, Alba A, Ampudia RM, Pastor X, Planas R, Riutort N, Alonso N, Pujol-Borrell R, Santamaria P, Vives-Pi M, Verdaguer J 2005 Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements. *Diabetes* 54:69-77
- ²⁸ Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC 2005 Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 48:2221-2228
- ²⁹ von Herrath MG, Sanda S, Herold KC 2007 Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? *Nat Rev Immunol* 7:988-994
- ³⁰ Dotta F, Censini S, van Halteren AGS, Marselli L, Masini M, Dionisi S Mosca F, Boggi U, Muda AO, Prato SD, Elliott JF, Covacci A, Rappuoli R, Roep BO, Marchetti P 2007 Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:5115-5120
- ³¹ Cirulli V, Zalatan J, McMaster M, Prinsen R, Salomon DR, Ricordi C, Torbett BE, Meda P, Crisa L 2006 The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes*. 55:1214-1222
- ³² Reynier F, Pachot A, Paye M, Xu Q, Turrel-Davin F, Petit, Hot A, Auffray C, Bendelac N, Nicolino M, Mouglin B, Thivolet C 2010 Specific gene expression signature associated with development of autoimmune type-1 diabetes using whole-blood microarray analysis. *Genes Immun* 11: 269-278
- ³³ Aust G, Krohn K, Morgenthaler NG 2006 Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis in monozygotic twins: case study as well as transcriptomic and immunohistological analysis of thyroid tissues. *Eur J Endocrinol* 154:13-20
- ³⁴ Ruiz-Riol M, Armengol MP, Colobran R, Sánchez A, Borràs FE, Lucas-Martin A, Martínez-Cáceres E, Pujol-Borrell R 2011 Analysis of the cumulative changes in

Graves' disease thyroid glands points to IFN signature, plasmacytoid DCs and alternatively activated macrophages as chronicity determining factors. *Journal of Autoimmunity*, Epub ahead of print, PMID: 21354768

³⁵ van der Pouw Kraan TC, van Gaalen FA, Huizinga TW, Pieterman E, Breedveld FC, Verweij CL 2003 Discovery of distinctive gene expression profiles in rheumatoid synovium using cDNA microarray technology: evidence for the existence of multiple pathways of tissue destruction and repair. *Genes Immun* 4:187-196

³⁶ Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L 2002 Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8:500-508

³⁷ Juuti-Uusitalo K, Mäki M, Kaukinen K, Collin P, Visakorpi T, Vihinen M, Kainulainen H 2004 cDNA microarray analysis of gene expression in coeliac disease jejunal biopsy samples. *J Autoimmun* 22:249-265

³⁸ Baechler EC, Batliwalla FM, Reed AM, Peterson EJ, Gaffney PM, Moser KL, Gregersen PK, Behrens TW 2006 Gene expression profiling in human autoimmunity. *Immunol Rev* 210:120-137

³⁹ Juuti-Uusitalo K, Mäki M, Kainulainen H, Isola J, Kaukinen K 2007 Gluten affects epithelial differentiation-associated genes in small intestinal mucosa of coeliac patients. *Clin. Exp. Immunol.* 150:294-305

⁴⁰ Armengol MP, Juan M, Lucas-Martín A, Fernández-Figueras MT, Jaraquemada D, Gallart T, Pujol-Borrell R 2001 Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol.* 159:861-873