

## Revisiones

# Diabetes mellitus tipo 1: autoinmunidad frente a la célula beta

A. ALBA, J. VERDAGUER Y M. VIVES-PI

*Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i les Aplicacions Diagnòstiques (LIRAD). Centre de Transfusió i Banc de Teixits. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. España.*

La diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad de etiología desconocida causada por la destrucción de las células productoras de insulina por parte del sistema inmunitario. Se conocen factores genéticos y desencadenantes ambientales que confieren susceptibilidad de desarrollar la enfermedad, así como alteraciones inmunológicas asociadas al proceso inflamatorio de los islotes que se detallan en esta revisión. Estos datos, junto con los modelos animales desarrollados –espontáneos o genéticamente manipulados– y los ensayos clínicos para evitar la manifestación de la enfermedad, han generado conocimiento y multitud de hipótesis, pero hasta el momento no existe prevención efectiva frente a la diabetes autoinmune. Es de esperar que las investigaciones presentes y futuras sobre la diabetes tipo 1 consigan determinar la etiología de la enfermedad y lograr la prevención o tratamientos de tolerancia inmunológica eficaces.

### TYPE 1 DIABETES MELLITUS: AUTOIMMUNITY TO $\beta$ -CELLS

Type 1 diabetes mellitus is a disease of unknown etiology caused by the destruction of insulin-producing cells by the immune system. Genetic and environmental predisposing factors that increase an individual's susceptibility to the disease, as well as immunological alterations associated with the inflammatory process of the islets, have been identified and are described in the present review. These data, together with the animal models that have been developed, whether spontaneous or genetically manipulated, and the clinical trials to prevent manifestation of the disease have generated knowledge and multiple hypotheses but effective prevention against autoimmune diabetes is still lacking. Hopefully, present and future research on type 1 diabetes will determine its etiology and will provide effective prevention or treatment.

*Key words:* Diabetes mellitus. Autoimmunity. Islets. Tolerance. Autoantigens.

### LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 ES UNA ENFERMEDAD AUTOINMUNITARIA

La autoinmunidad se define como una reacción del sistema inmune contra componentes del organismo, causada por una pérdida de tolerancia hacia las moléculas propias. Este ataque es la causa de las enfermedades autoinmunitarias. La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una de estas enfermedades y se inicia generalmente en la infancia o la adolescencia. Su incidencia varía enormemente en función del país: los estudios epidemiológicos indican una máxima incidencia en los países nórdicos y en Cerdeña (21 casos nuevos al año por cada 100.000 habitantes), intermedia en Europa y Estados Unidos (4-14 casos) y mínima en Japón (0,8).

La destrucción de las células  $\beta$ , productoras de insulina de los islotes de Langerhans, es la causa del fallo en la secreción de insulina y de los síntomas clínicos de la enfermedad. Los islotes, componente endocrino del páncreas, son agrupaciones esféricas de células  $\alpha$  (un 12%, productoras de glucagón),  $\beta$  (un 80% productoras de insulina),  $\delta$  (un 6% productoras de somatostatina) y PP (un 2% productoras de polipéptido pancreático) encapsuladas en colágeno. Un adulto tiene aproximadamente un millón de islotes dispersos entre los acinos exocrinos, lo que representa un 2% de la masa celular pancreática<sup>1</sup>.

Correspondencia: Dra. M. Vives-Pi.  
Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i les Aplicacions Diagnòstiques (LIRAD).  
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.  
Crta. del Canyet, s/n. 08916 Badalona. Barcelona. España.  
Correo electrónico: vivespi@ns.hugtip.scs.es

Manuscrito recibido el 24-02-2003; aceptado para su publicación el 13-10-2003.

*Palabras clave:* Diabetes mellitus. Autoinmunidad. Islotes. Tolerancia. Autoantígenos.

Es un hecho demostrado que esta enfermedad es la consecuencia de una respuesta autoinmunitaria específica contra las células  $\beta$ , pero a pesar de los importantes avances en el conocimiento de los fenómenos que acompañan a esta pérdida del equilibrio de la tolerancia hacia los autoantígenos insulares<sup>2</sup>, la etiopatogenia de la enfermedad mantiene muchas incógnitas, entre ellas el elemento o los elementos iniciadores del proceso.

Hay factores que contribuyen a que un individuo sea susceptible de desarrollar la enfermedad, pero que por sí solos no la desencadenan. Es el caso de la predisposición genética en la que ciertos haplotipos de los antígenos de histocompatibilidad de clase II (HLA-DR3/4, DQ) así como otros *loci* de susceptibilidad (IDDM)<sup>3</sup> contribuirían a una presentación más eficaz de un péptido relevante en la enfermedad. Los factores ambientales –incidencia estacional, factores geográficos, dieta– también influyen en la aparición de la entidad<sup>4</sup>. Sin embargo, estos factores no son determinantes, ya que los gemelos idénticos de pacientes diabéticos desarrollan la enfermedad sólo en un 50% de los casos. La contribución de factores ambientales en un individuo genéticamente susceptible facilitaría el proceso autoinmunitario de destrucción selectiva<sup>5</sup> iniciado por un elemento desconocido.

## ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS ASOCIADAS A LA DIABETES MELLITUS TIPO 1

El inicio clínico de la DM1 coincide con la fase final de los procesos de destrucción de las células  $\beta$  iniciados durante el período asintomático o prediabetes. Esta interesante etapa –de difícil estudio debido a la falta de manifestaciones y a la inaccesibilidad del tejido diana– incluye el desencadenamiento y la progresión de la agresión que cursa con inflamación de los islotes (insulitis), hiperexpresión de moléculas de HLA, presencia de autoanticuerpos antiisloote y disminución de la función de la célula  $\beta$ .

El avance de la destrucción se debe a los procesos de migración leucocitaria<sup>6</sup>. Las células endoteliales de los capilares insulares regularían la llegada leucocitaria a los tejidos, y sus “poros” ayudarían a una rápida difusión de los mensajeros químicos entre la sangre y el espacio insular: la insulitis, infiltración leucocitaria de los islotes, va acompañada de un incremento de los elementos vasculares de los tejidos, aspecto que sugiere la participación activa del endotelio en el proceso patogénico de la DM1.

La lesión inflamatoria de los islotes, o insulitis, es una característica común de los páncreas procedentes de pacientes con DM1<sup>7</sup>. El estudio de estos órganos de individuos diabéticos fallecidos justo en el inicio de la enfermedad<sup>8-10</sup> ha permitido definir importantes alteraciones inmunológicas. Tras identificar la disminución del número de células  $\beta$ , se ha descrito una infiltración

leucocitaria relativamente escasa con predominio de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y algunos macrófagos, así como depósitos de inmunoglobulinas y complemento. Se ha detectado una clara hiperexpresión de HLA de clase I y de moléculas asociadas al procesamiento antígenico endógeno (transportador de antígenos TAP-1) en las células insulares, lo que sugiere un incremento de la presentación antígenica y que la célula  $\beta$  tiene un papel activo en el proceso. El perfil de citocinas de este microambiente es el característico de linfocitos T citotóxicos: interleucina (IL) 2, 4 y 10, perforina, interferón (IFN)  $\alpha$  y  $\beta$  e IL-6. Junto con la incidencia estacional de la enfermedad y la asociación con algunas infecciones virales (rubéola, parotiditis, virus Coxsackie), la presencia de interferones de tipo I es el dato que apoya la hipótesis viral en la etiología de la DM1, aunque el mecanismo de una infección aguda de las células  $\beta$  parece incompatible con el largo período asintomático que precede a la enfermedad. El mimetismo molecular entre agentes infecciosos y autoantígenos podría inducir una reacción cruzada autoinmunitaria dirigida contra epítopos de proteínas propias en individuos susceptibles; este mecanismo, que puede estar implicado en la patogenia de algunas enfermedades como la miocarditis posviral o la enfermedad de Chagas, tampoco se ha demostrado en la DM1, en la que se requeriría una presentación antígenica apropiada del antígeno mimetizado por parte de la célula diana y la capacidad de inducir una respuesta proliferativa y no anergizante en la célula T efectora.

La caracterización de los linfocitos autorreactivos ha despertado especial interés en los últimos años: además de definirse las subpoblaciones predominantes, se ha precisado que posiblemente la regulación de la respuesta hacia un componente Th1 determina el desarrollo de la enfermedad<sup>11</sup>. Las citocinas de tipo 1, producidas por linfocitos T (IFN- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral [TNF]  $\beta$ , IL-2 e IL-12) se relacionan con una insulitis destructiva, mientras que las de tipo Th2 (IL-4 e IL-10) estarían asociadas con una insulitis benigna. El reclutamiento de estas células hacia los islotes es un paso crítico en la patogenia de la enfermedad. Las quimiocinas, citocinas que promueven la migración de células mononucleares, podrían dirigir el tráfico hacia la célula diana: la expresión temporal de quimiocinas y la polarización de su expresión por células Th1 frente a Th2 determinaría la composición de la insulitis y la posterior destrucción o protección de las células  $\beta$ . El ratón transgénico para el gen de la quimiocina CCL2 (MCP-1) bajo la regulación del gen de la insulina<sup>12</sup> muestra una importante insulitis monocítica sin progresión hacia la enfermedad, lo que indica, por una parte, la influencia de dicha quimiocina en el tráfico de la insulitis y, por otra, que sola no es capaz de provocar el ataque selectivo hacia las células  $\beta$ . Resultados de estudios *in vitro* indican que las células  $\beta$  de rata bajo el estímulo de IL-1 son capaces de expresar ciertas quimiocinas, que podrían afectar al reconocimiento de la célula  $\beta$  por parte del sistema inmunitario<sup>13</sup>.

## RESPUESTA HUMORAL: LOS AUTOANTICUERPOS SON MARCADORES DE AUTOINMUNIDAD

Durante el período asintomático de inicio y progresión de la destrucción de la célula  $\beta$  aparecen anticuerpos circulantes antiislets, marcadores de autoinmunidad humorla, que pueden ayudar a identificar a los individuos en fase prediabética y, posteriormente, a distinguir esta enfermedad autoinmunitaria de otras formas de diabetes mellitus. Hasta el momento, estos marcadores sirven, junto con los datos metabólicos, para llevar a cabo un mejor seguimiento del paciente.

Los marcadores ICA (*islet cell antibodies*), descritos en 1975<sup>14</sup>, se detectan mediante inmunofluorescencia indirecta, incubando una muestra de suero sobre secciones de páncreas normal y expresando la concentración de anticuerpos en unidades JDF (*Juvenile Diabetes Foundation*). Estos marcadores engloban a un conjunto de anticuerpos contra diferentes determinantes antigenicos, entre ellos GAD (descarboxilasa del ácido glutámico), insulina e IA-2 (proteína tirosin-fosfatasa-like). Se han desarrollado ensayos moleculares específicos para la detección de cada anticuerpo, que se han estandarizado a escala mundial.

La mayoría de los pacientes prediabéticos y el 90% de los diabéticos presentan autoanticuerpos anti-GAD y/o IA-2. Los anticuerpos antiinsulina son muy determinantes en la fase prediabética en niños. La positividad de varios de estos anticuerpos incrementa el riesgo de desarrollo de la enfermedad y permite seleccionar a los individuos en estudios de prevención.

Los pacientes con DM1 tienen células T autorreactivas contra varios autoantígenos insulares, lo que sugiere que, si bien en la fase inductiva de la enfermedad la respuesta iría dirigida contra uno o unos pocos autoantígenos, la progresión de la destrucción requeriría el "esparcimiento" de una serie de moléculas (GAD65, GAD67, ICA512, IA-2b, GM2-1 gangliósido, CPH, ICA69, Imogen, hsp65, periferina, sinapsina...), que amplificarían la respuesta y darían paso a los autoanticuerpos contra moléculas de las células  $\beta$ , como fenómeno secundario a la liberación del contenido citoplasmático. Ninguno de estos autoanticuerpos reconoce componentes de la membrana de las células endocrinas insulares vivas (ICSA)<sup>15</sup>, por lo que se cree que no desempeñan un papel citotóxico. En experimentos en modelos animales se ha demostrado que no son necesarios para la transferencia de la enfermedad, contrariamente a lo que ocurre con los linfocitos T<sup>16</sup>.

Otro parámetro inmunológico, además de los autoanticuerpos, es la determinación de linfocitos T autorreactivos contra antígenos insulares; esta técnica está actualmente en fase de estandarización<sup>17</sup>.

## ¿POR QUÉ SE DESTRUYE LA CELULA $\beta$ ?

A pesar de la expresión en el timo de autoantígenos insulares (insulina, glucagón y GAD67)<sup>18</sup>, algunas células

T autorreactivas escapan hacia la circulación periférica. Para su activación en la periferia se requieren ciertas condiciones microambientales que capaciten a las células T en el entorno de la célula diana, como la frecuencia de precursores específicos autorreactivos; el estado óptimo de activación y expresión de moléculas accesorias coestimuladoras; la accesibilidad del autoantígeno, y la posibilidad de encuentro con elementos ambientales que favorezcan el mimetismo y las reacciones inflamatorias.

El órgano diana podría desempeñar un papel activo, ya que presenta antígenos, o quizás un daño inicial de la célula  $\beta$  podría dispersar sus autoantígenos al entorno donde serían presentados por células presentadoras profesionales (APC). Existen evidencias a favor de esto último, ya que en pacientes con inicio clínico de la enfermedad se ha observado hiperexpresión de moléculas de la vía endógena (HLA de clase I, TAP1)<sup>19</sup> y exógena (HLA de clase II) de procesamiento y presentación antigenica, así como de moléculas de adhesión (ICAM-1)<sup>20</sup>, aunque los valores normales de MHC de clase I serían suficientes para el reconocimiento por linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreactivos. Otras moléculas implicadas serían las coestimuladoras (B7.1 y B7.2), sin las que no hay activación de la célula T. La variación de los patrones de expresión en estado de inflamación de los islotes iría a favor de la recientemente postulada teoría de activación del sistema inmunitario ante "señales de peligro" más que hacia componentes "extraños"<sup>21</sup>.

La selectividad del ataque es, pues, un misterio por resolver: algunos autoantígenos son comunes a los 3 tipos celulares endocrinos<sup>22</sup>, no así la insulina, cuya expresión es exclusiva de la célula  $\beta$ . Sin embargo, a pesar de que se trata de una enfermedad autoinmunitaria célula-específica, recientemente se ha descrito un proceso inicial autoinmunitario humoral y celular contra células del sistema nervioso que envuelven los islotes (células de Schwann periinsulares)<sup>23</sup>. Basándose en este trabajo, se postula una nueva hipótesis según la cual las primeras fases del ataque no serían selectivas de células  $\beta$ . Otro factor determinante en la destrucción selectiva sería la gran sensibilidad de las células productoras de insulina a situaciones de estrés (citocinas, oxidación, etc.). Los candidatos a efectores de muerte celular son perforina (que se ha detectado en los islotes infiltrados), granzimas, óxido nítrico, Fas y FasL, TNF, etc. El ataque autoinmunitario y la persistencia de hiperglucemia causan un aumento en la producción de radicales libres, por lo que una disminución de las defensas antioxidantes, producto de los llamados genes de respuesta protectora (glutatión, HO-1, hsp...) puede aumentar la susceptibilidad al daño celular, ya que no bloquean la apoptosis mediada por NFK- $\beta$ . La expresión apropiada de estos genes en respuesta a las citocinas podría generar una protección en la célula víctima y aumentar su resistencia.

## UN MODELO ANIMAL: EL RATÓN NOD

La inaccesibilidad de tejido para estudiar la etapa prediabética en humanos (únicamente en Japón se rea-

lizan biopsias pancreáticas) supone un obstáculo en el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad. Este hecho ha propiciado el desarrollo de métodos alternativos, como los modelos animales espontáneos, inducidos o transgénicos. Entre los modelos espontáneos, destaca, por su similitud con la DM1 humana, el ratón no obeso diabético (NOD).

El ratón NOD desarrolla un proceso autoinmunitario que resulta en una DM1 como consecuencia de la destrucción selectiva de las células  $\beta$  a una edad temprana<sup>24</sup>. Al igual que en los humanos, se asocian a la enfermedad alelos específicos de MHC de clase II (I-Ag7) y otros *loci* ya mapeados (*Idd*)<sup>25</sup>. Este modelo presenta insulitis, autoanticuerpos y respuesta autoinmunitaria contra otros órganos endocrinos (tiroiditis, sialitis, prostatitis). El ataque se inicia a las 3-4 semanas (insulitis) y la enfermedad se manifiesta a los 3-7 meses. La incidencia de la enfermedad es más elevada en hembras (60-90%) que en machos (15-40%)<sup>26</sup>, lo que sugiere una influencia hormonal en el proceso; además, la castración de los machos eleva la incidencia de diabetes hasta igualar los valores de las hembras. La diabetes en el ratón NOD es poligénica, es decir, con influencia de varios genes de susceptibilidad (*Idd*), uno de los cuales es *Idd-1* que se encuentra en la región MHC y tiene alta homología con el DQw8 humano<sup>27</sup>; otros genes (*Idd-2* hasta *Idd-18*) se encuentran fuera de esta región<sup>28</sup>.

La diabetes en este modelo puede transferirse a individuos sanos a través de linfocitos, y depende tanto de T CD4 como de CD8. Parece ser que las células CD4 serían más eficientes en la transferencia de la enfermedad debido a la producción de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), tóxicas para la célula  $\beta$  y que reclutan otras células para amplificar la respuesta, mientras que los linfocitos T CD8 serían necesarios para iniciar la lesión, ya que aparecen antes en la insulitis. En el páncreas del ratón NOD se han detectado también quimiocinas asociadas a la evolución de la enfermedad<sup>29</sup>.

El ratón NOD es la base genética de numerosos modelos transgénicos y *knock-out*, en los que se determina el papel de una molécula, induciendo o bloqueando su expresión, en el desarrollo de la enfermedad. Este modelo cuenta con un "homólogo" resistente a la enfermedad, el ratón no obeso diabético resistente (NOR)<sup>30</sup>, que no desarrolla insulitis ni diabetes, aunque su genoma es idéntico al del NOD en un 88%, incluyendo el haplotipo H-2g7 altamente diabetogénico, debido a que el 12% del genoma distinto al NOD contiene al menos 5 *loci* de resistencia a la enfermedad, entre ellos el alelo *Idd-13*.

## PERSPECTIVAS DE FUTURO: PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

Por el momento, no existe prevención efectiva frente a la DM1, aunque ésta es la finalidad de los recientes ensayos clínicos de administración de antígenos

insulares: en sujetos con alto riesgo de desarrollar DM1 pueden aplicarse tratamientos de tolerancia que sirvan para impedir el desarrollo de la enfermedad, como es el caso de la administración de insulina a través de las mucosas<sup>31</sup>. Se hipotetiza que podría actuar como inmunomodulador, induciendo tolerancia o favoreciendo el "reposo" de la célula  $\beta$ . Otra estrategia actual es la investigación de sustancias que prevengan la destrucción de los islotes, como la nicotinamida, o que puedan regenerar los islotes, como los derivados del tungstato<sup>32</sup>. Sin embargo, los resultados de estos ensayos clínicos con insulina y nicotinamida no son muy esperanzadores<sup>33,34</sup>.

Los pacientes con DM1 dependen de la administración de insulina exógena para controlar sus concentraciones de glucosa. Para aumentar la calidad de vida y disminuir el riesgo de complicaciones secundarias, las perspectivas de futuro se enfocan hacia campos revolucionarios como la terapia génica<sup>35</sup>, las células pluripotenciales o troncales<sup>36</sup> y el trasplante de islotes<sup>37</sup>. La finalidad es, en todos los casos, conseguir una fuente de insulina endógena con regulación metabólica. La terapia génica consiste en introducir en el individuo el gen de la insulina en otros tipos celulares distintos a las células  $\beta$ , por ejemplo en hepatocitos o células musculares; esto se hace a través de vectores virales que en ocasiones son destruidos por el propio sistema inmunitario. Las células pluripotenciales son células no diferenciadas de origen embrionario o del propio individuo adulto, a partir de las cuales puede derivar cualquier tipo celular: la célula  $\beta$ , así generada, podría ser autóloga y, por tanto, no induciría rechazo al implantarse en el individuo ni requeriría promotores distintos del mismo promotor de la insulina. Por contra, existe el riesgo de que se produzca de nuevo el ataque autoinmunitario que inicialmente causó la enfermedad (recurrencia). En el caso de trasplante de islotes purificados, un problema importante es la escasez de donantes (se necesita un mínimo de 2 donantes para conseguir islotes para un receptor), a lo que se añade un proceso enzimático complejo y estresante para la obtención de islotes y una terapia inmunosupresora de por vida para los pacientes trasplantados. Sin embargo, el recientemente aplicado protocolo de Edmonton (con cambios en la cantidad de islotes implantados y en el protocolo de inmunosupresión) ha logrado resultados esperanzadores en ese campo, ya que se ha conseguido una independencia de la insulina en el 80% de los pacientes transplantados después de un año, sin que se hayan observado complicaciones importantes.

La investigación sobre diabetes es un campo prioritario por la prevalencia y la gravedad de la enfermedad. Es de esperar que los próximos avances en este campo consigan determinar las causas de la diabetes DM1 y conseguir su prevención mediante la aplicación de vacunas o tratamientos de tolerancia eficaces.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bonner-Weir S, Smith FE. Islets of Langerhans: morphology and its implications. En: Kahn CR, Weir GC, editors. *Joslin's diabetes mellitus*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993; p. 15-28.
2. Bach JF, Chatenoud L. Tolerance to islet autoantigens in type I diabetes. *Annu Rev Immunol* 2001;19:131-61.
3. Vyse TJ, Todd JA. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 1996;85:311-8.
4. Vives M, Somoza N, Vargas F, Pujol-Borrell R. Overexpression of MHC proteins in pancreatic islets: a link between cytokines, viruses, breach of tolerance and insulin dependent diabetes mellitus. En: Blair GE, Pringle CR, Maudsley DJ, editors. *Modulation of MHC antigen expression and disease*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995; p. 361-89.
5. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996;35:291-7.
6. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;78:301-14.
7. Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, Richmond JA, Weir RS. The histopathology of the pancreas in type 1 diabetes: a 25 year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 1986;29:267-74.
8. Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C, Vives-Pi M, Fernandez-Figueras MT, Ariza A, et al: Pancreas in recent onset insulin dependent diabetes mellitus: Changes in HLA, Adhesion molecules and autoantigens, Restricted T cell receptor V $\beta$  usage and cytokine profile. *J Immunol* 1994;153:1360-77.
9. Vives-Pi M, Vargas F, James RFL, Trowsdale J, Costa M, Sospedra M, et al. Proteasome subunits, low-molecular-mass polypeptides 2 and 7 are hyperexpressed by target cells in autoimmune thyroid disease but not in IDDM. *Tissue Antigens* 1997;50:153-63.
10. Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992;90:1901-10.
11. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998;14:129-51.
12. Grewal IS, Rutledge BJ, Fiorillo JA, Gu L, Gladue RP, Flavell RA, et al. Transgenic MCP-1 in pancreatic islets produces monocyte-rich insulitis without diabetes. *J Immunol* 1997;159:401-8.
13. Chen MC, Proost P, Gysemans C, Mathieu C, Eizirik DL. Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells. *Diabetologia* 2001;44:325-32.
14. Botazzo GF, Florin-Christensen A, Domínguez D. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiency. *Lancet* 1974;2:1279-83.
15. Vives M, Somoza N, Soldevila G, Gomis R, Lucas A, Sanmartí A, et al: Re-evaluation of autoantibodies to islet cell membrane in insulin dependent diabetes: failure to detect islet cell surface antibodies using human islet cells as substrate. *Diabetes* 1992;41:1624-31.
16. Christianson SW, Shultz LD, Leiter EH. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* 1993; 42:44-55.
17. Peakman M, Tree TI, Endl J, Van Endert P, Atkinson MA, Roep BO. Characterization of preparations of GAD65, proinsulin, and the islet tyrosine phosphatase IA-2 for use in detection of autoreactive T-cells in type 1 diabetes: report of phase II of the Second International Immunology of Diabetes Society Workshop for Standardization of T-cell assays in type 1 diabetes. *Diabetes* 2001;50:1749-54.
18. Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Domínguez O, Juan M, Foz-Sala M, Pujol-Borrell R. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol* 1998;161:5918-29.
19. Vives-Pi M, Armengol MP, Alcalde L, Somoza N, Vargas F, Jaraquemada D, et al. Expression of Transporter Associated with Antigen Processing-1 (TAP-1) in the endocrine cells of human pancreatic islets: effect of cytokines and evidence of hyperexpression in IDDM. *Diabetes* 1996;45:779-88.
20. Vives M, Soldevila G, Alcalde L, Lorenzo C, Somoza N, Pujol-Borrell R. Expression and Modulation of Adhesion Molecules ICAM-1 and LFA-3 in human islet cells. *Diabetes* 1991;40:1382-90.
21. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-5.
22. Vives-Pi M, Somoza N, Vargas F, Armengol P, Sarri Y, Wu JY, et al. Expression acid decarboxylase (GAD) in the cytoplasm of alpha, beta and delta cells in normal and diabetic human islets: implications for the pathogenesis of type I diabetes. *Clin Exp Immunol* 1993;92:391-6.
23. Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta cell exclusive. *Nature Med* 2003;9:198-205.
24. Makino S, Tochino Y. The spontaneously non obese diabetic mouse. *Exp Anim* 1978;27:27-9.
25. Wicker LS, Todd JA, Peterson LB. Genetic analysis of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 1995;13:179-200.
26. Pozzilli P, Signore A, Williams AJK, Beales PE. NOD mouse colonies around the world-recent facts and figures. *Immunol Today* 1993;14:193-6.
27. Todd JA, Aitman TJ, Cornall RJ, Ghosh S, Hall JRS, Hearne CM, et al. Genetic analysis of autoimmune type one diabetes in mice. *Nature* 1991;351:542-7.
28. Podolkin PL, Denny P, Armitage N, Lord CJ, Hill NJ, Levy ER, et al. Localization of two insulin-dependent diabetes (Idd) genes to the Idd10 region on mouse chromosome 3. *Mamm Genome* 1998;9:283-6.
29. Cameron MJ, Arreaza GA, Grattan M, Meagher C, Sharif S, Burdick MD, et al. Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes. *J Immunol* 2000;165:1102-10.
30. Prochazka M, Serreze DV, Frankel WN, Leiter EH. NOR/Lt mice: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice. *Diabetes* 1992;41:98-106.
31. Hanninen A. Prevention of autoimmune type 1 diabetes via mucosal tolerance: is mucosal autoantigen administration as safe and effective as it should be? *Scand J Immunol* 2000;52:217-25.
32. Barbera A, Gomis RR, Prats N, Rodríguez-Gil JE, Domingo M, Gomis R, et al. Tungstate is an effective antidiabetic agent in streptozotocin-induced diabetic rats: a long-term study. *Diabetologia* 2001;44:507-13.
33. Philips JC, Scheen AJ. Registre Belge du Diabète. Prevention strategies of type 1 diabetes: the focus in 2003. *Rev Med Liege* 2003; 58:211-9.
34. Couzin J. Clinical trials. Diabetes' brave new world. *Science* 2003;300:1862-5.
35. Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 2001;408:420-1.
36. Reig JA, Enseñat-Waser R, Roche E, Soria B. Terapia celular en la diabetes mellitus. *Endocrinología y Nutrición* 2002;49:260-8.
37. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Kettner GS, Toth E, Warren GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *New Engl J Med* 2000;343:230-8.