



ACTUALIZACIÓN

APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS BETA DEL PÁNCREAS DURANTE LA DIABETES DE TIPO 1

PANCREATIC BETA CELLS APOPTOSIS IN TYPE 1 DIABETES

Camila Manrique¹, Diego G. Silva²

1. MD. Departamento de Endocrinología, Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
2. MD. PhD. Division of Immunology and Genetics, John Curtin School of Medical Research, Australian National University.

* Correspondencia: diego.silva@anu.edu.au

Resumen

La diabetes de tipo 1 se produce como resultado de la destrucción de las células β del páncreas. Durante la progresión de la enfermedad las células β se ven crónicamente atacadas por un infiltrado inflamatorio de tipo autoinmune con gran cantidad de productos entre los cuales se encuentran citocinas y derivados de la oxidación. Estos compuestos son dañinos para la célula β , y la obligan a montar mecanismos de defensa para contrarrestar el ataque inmunológico inespecífico. Sin embargo, y debido a la cronicidad de la inflamación, las células β terminan expresando moléculas que al ser activadas inducen apoptosis de manera específica, de la cual no pueden escapar y terminan por destruirse. En este artículo hacemos una revisión de los mecanismos que conllevan a la apoptosis de las células β enfatizando en la repuesta de éstas al ambiente adverso. El estudio de la biología de la célula β es indispensable para comprender la

fisiopatología de la diabetes de tipo 1 y así acercarse al desarrollo de terapias para prevenir o tratar la enfermedad.

Palabras clave: apoptosis, diabetes mellitus tipo 1, páncreas, citocinas, células.

Summary

Type 1 diabetes is the result of the immune destruction of the β cells islet. During the progression of the disease, β cells are chronically attacked by an autoimmune infiltrate with inflammatory products including cytokines and oxidation derivatives. In response to this adverse inflammatory environment, β cells are able to produce a protective response to avoid non-specific apoptosis signals; however it renders them susceptible to specific cell death. In this paper, we review the mechanisms of β cell death in type 1 diabetes, focusing on their ability to adapt to inflammation. These studies add to the



understanding of the pathophysiology of type 1 diabetes and contribute to the development of therapies to prevent or treat the disease.

Key words: apoptosis, diabetes mellitus type 1, pancreas, cytokines, cells.

Introducción

La diabetes de tipo 1 se desarrolla como consecuencia de la destrucción de las células β del páncreas. Los islotes pancreáticos, estructuras en donde se encuentran las células β , se ven crónicamente atacados por un infiltrado de células inmunológicas autoreactivas (llamado insulinitis) que se sitúa alrededor de éstos y aumenta a medida que progresa la enfermedad (Figura 1). Posteriormente y debido a un cambio homeostático tanto en el componente celular inmunológico como en el endocrino, la insulinitis termina por destruir las células β induciendo así los síntomas clínicos de la diabetes de tipo 1 (1).

Múltiples factores contribuyen a la muerte de las células β entre los cuales los más estudiados son los productos de la insulinitis que incluyen las citocinas proinflamatorias, el óxido nítrico, las

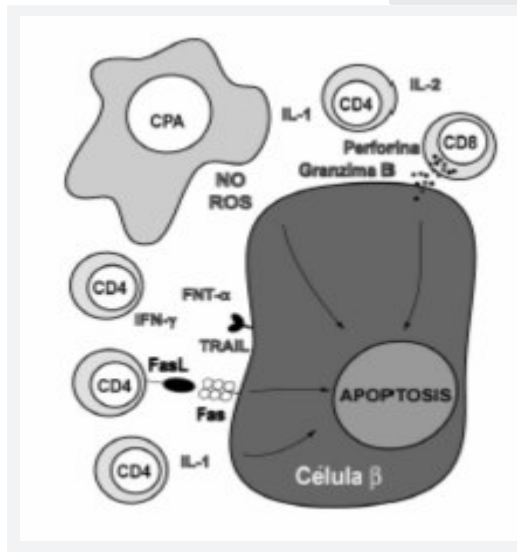


Figura 2. Las células inflamatorias que conforman la insulinitis producen una gran cantidad de moléculas que afectan la célula β . Las citoquinas proinflamatorias como el interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$), el factor de necrosis tumoral alfa ($\text{FNT-}\alpha$), la interleuquina 1 (IL-1), y otras sustancias derivadas de la inflamación como el óxido nítrico (NO), las especies reactivas de oxígeno (ROS), la perforina, la granzima B, el ligando inductor de apoptosis relacionado con FNT (TRAIL) y las moléculas proapoptóticas Fas y Fas ligando (FasL) contribuyen de una manera u otra a la muerte de las células β . CD4, linfocitos T CD4 positivos; CD8, linfocitos T CD8 positivos; CPA, células presentadoras de antígeno.

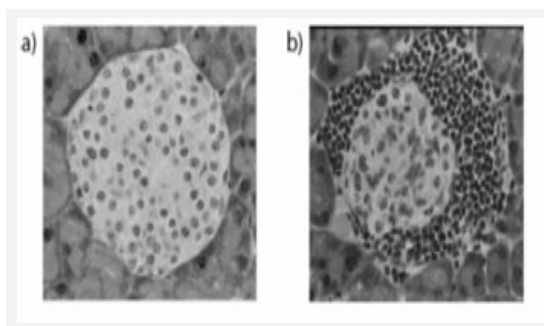


Figura 1. Fotografía de un islote de Langerhans, estructura anatómica en donde se encuentran las células β . Comparados con islotes de ratón sanos (a), los islotes de un ratón pre-diabético (b) son rodeados por un infiltrado inflamatorio de tipo autoinmune compuesto principalmente por células linfoides mononucleares. Tinción de H&E, 40X.

especies reactivas derivadas del oxígeno y las moléculas desencadenantes de apoptosis Fas y FasL (Figura 2). Sin embargo, los avances científicos en los últimos años han demostrado que las células β no son entes pasivos en este proceso ya que tienen la capacidad de responder al ataque inmunológico (2). En esta respuesta están involucrados mecanismos moleculares adaptativos y de defensa por medio de los cuales las células β pueden resistir al ataque inmunológico inespecífico (3, 4) (Figura 3).

En la primera parte de este artículo hacemos una revisión de las moléculas producidas por la insulinitis y que tienen un efecto nocivo directo sobre las células β , ya sea induciendo muerte

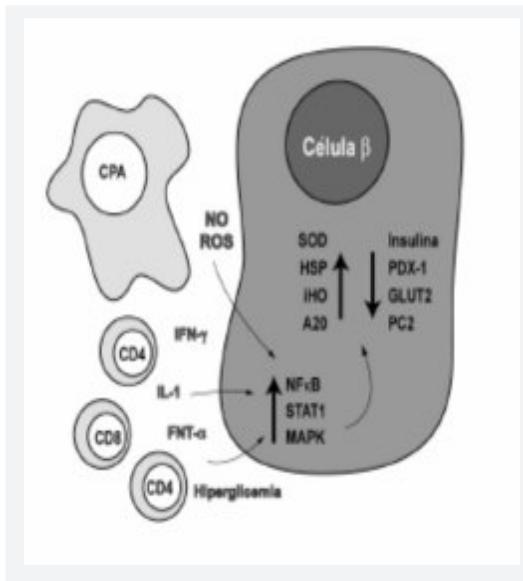


Figura 3. Mecanismos de defensa de las células β . Al verse atacadas por un ambiente adverso, las células β montan mecanismos de defensa que las protegen de la apoptosis. Esta respuesta está principalmente controlada por tres factores de transcripción: el factor nuclear kappa B (NF κ B), el transductor de señal y activador de transcripción 1 (STAT1) y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). Estos factores modifican la expresión de genes en la célula β , causando una disminución en el metabolismo basal y bajando la expresión de insulina, PDX-1, GLUT2 y PC2. Al mismo tiempo las células β incrementan la producción de proteínas de choque térmico (HSP), la superóxido dismutasa (SOD), la hemoxigenasa inducible (iHO) y la proteína anti-apoptótica A20 (A20), todas ellas contribuyen para proteger a la célula contra el daño celular no específico.

celular o modificando su metabolismo normal. En la segunda parte nos enfocamos en los mecanismos de defensa desarrollados por las células β en respuesta a la insulinitis y analizamos la hipótesis de que durante este proceso las células β a pesar de estar protegidas contra señales apoptóticas inespecíficas, quedan expuestas a una muerte celular específica mediada por Fas-FasL (5). El entendimiento de estos procesos celulares básicos es de vital importancia para diseñar nuevos tratamientos encaminados a prevenir o tratar la diabetes de tipo 1.

El ambiente que rodea los islotes de Langerhans como factor determinante en desarrollo de la diabetes de tipo 1

La apoptosis de las células β del páncreas es el fenómeno final en el desarrollo de la diabetes de tipo 1. Múltiples moléculas de señalización y citocinas están involucradas en este proceso, incluyendo citocinas proinflamatorias (7,8), el óxido nítrico (NO) (9), las especies reactivas de oxígeno (ROS) (10), la perforina (11), el ligando inductor de apoptosis relacionado con FNT (TRAIL) (12), los ácidos grasos libres (13), la hiperglicemia (14) y el estrés del retículo endoplasmático (15), siendo la vía de Fas/Fas ligando (FasL) una de las principalmente implicadas (16) (Figura 2).

Contribución de las citocinas proinflamatorias a la muerte de las células β

El efecto pleiotrópico de las citocinas hace difícil delimitar el papel que cada una de ellas desempeña en la patogénesis de la diabetes de tipo 1. Las citoquinas pro-inflamatorias más destacadas y que tienen efectos directos sobre la célula β son el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), la interleucina-1 beta (IL-1 β) y el interferón gamma (IFN- γ) (16).

Cada una de estas citoquinas, dependiendo de su concentración, alterará el metabolismo normal de la célula β afectando la síntesis y secreción de insulina. El cultivo de las células β en presencia de IFN- γ induce una reducción tanto del contenido celular de insulina como de su secreción en respuesta a la glucosa (17,18). De forma similar, la presencia de IL-1 β estimula la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en la célula β , lo cual induce aumento de la concentración de NO, inhibiendo la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (19). Las citocinas pue-



den llegar a tener efectos sinérgicos; los bajos niveles de IL-1 α son incapaces de inducir la producción de iNOS, pero cuando la misma dosis se combina con IFN- γ se induce la expresión de iNOS en una magnitud similar a la inducida por dosis altas IL-1 α (20).

Las bajas concentraciones de FNT- α inducen la muerte de las células β mediante la vía del NO, mientras que altas concentraciones inducen apoptosis por vías independientes de este (21). La estimulación de células β con FNT- α resulta en la activación de cascadas de señalización intracelular que causan apoptosis por medio de la activación de las caspasas, algunas de las moléculas involucradas son TRADD, FADD, FLICE y ceramida (22). Otras cascadas incluyen la activación de los factores de la transcripción STAT1 y del factor regulador IFN 1 (IRF-1) que son capaces de inducir apoptosis de la célula β de forma caspasa independiente (23,24).

Las citocinas proinflamatorias también contribuyen a la muerte de las células β de manera indirecta, ya que promueven el desarrollo y mantenimiento de la insulinitis induciendo la producción de sustancias quemotrayentes encaminadas a incrementar la respuesta celular autoinmune (16). A su vez, inducen la sobreexpresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y II (25,26) aumentando la presentación de antígenos propios de las células β por parte de células presentadoras de antígenos e induciendo la expresión de moléculas de adhesión tipo ICAM-1. Todo esto incrementa la susceptibilidad de las células β al ataque de los linfocitos T autoreactivos e indirectamente contribuyen a su muerte (27).

El óxido nítrico y el estrés oxidativo son nocivos para las células β

El óxido nítrico (NO) tiene múltiples acciones

biológicas y su producción esta íntimamente relacionada con el daño y muerte de las células β (28). La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la oxidación de L-arginina para producir NO y L-citrulina. La familia NOS está compuesta por dos isoformas constitutivas, la neuronal (nNOS o tipo I) y la endotelial (eNOS o tipo III), y una isoforma inducible (iNOS o tipo II) (29). Al reaccionar con el oxígeno y el agua, el NO forma nitratos y nitritos. Cuando estos últimos se combinan con superóxido forman peroxinitrito (ONOO $^-$), el cual genera peróxido de hidrógeno y más superóxido que finalmente causa fragmentación del ADN (28).

El NO producido extra e intracelularmente es citotóxico para los islotes pancreáticos (20). La IL-1 α , el FNT- α y el IFN- γ inducen la producción de NO al promover la expresión de iNOS en los macrófagos, las células endoteliales y las células β . El daño causado por la IL-1 α , el FNT- α y el IFN- γ a las células β parece ser dependiente de peroxinitrito ya que se han encontrado niveles más altos de esta molécula en islotes de ratones diabéticos NOD que en ratones no diabéticos (30). El NO parece afectar también el metabolismo normal de las células β ya que el estrés oxidativo, medido por niveles plasmáticos de nitratos y nitritos, se ha correlacionado positivamente con los requerimientos de insulina en la diabetes de tipo 1 (31).

Al tiempo que producen NO, las células inflamatorias también producen especies reactivas de oxígeno (ROS) (32). Las ROS inducen peroxidación lipídica, la cual puede ser medida por producción de aldehído. La incubación de islotes de roedores con IL-1 α , el FNT- α y el IFN- γ aumenta los niveles de aldehído, fenómeno que puede ser bloqueado por la adición de antioxidantes pero no por los inhibidores de iNOS, hecho que sugiere que la producción de ROS y la peroxidación lipídica

juegan un papel fundamental en la necrosis de células inducida por citoquinas (10,33).

Diferentes especies animales tienen respuestas disímiles al daño producido por ROS. Por ejemplo, los islotes humanos y los porcinos son resistentes al aloxano, mientras que las células de roedores son altamente sensibles a la muerte inducida por este compuesto (34). Además, los islotes de ratas son más susceptibles a agentes oxidativos y a citoquinas que los islotes humanos (35). Las células de roedores expresan bajos niveles de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa, lo que las hace más vulnerables al daño mediado por radicales libres (36). Lo anterior indica que, aún cuando los estudios en animales son indispensables para entender procesos biológicos básicos, se debe ser cauto en extrapolar estos resultados a células humanas.

Las células se adaptan a la lesión inmunológica

Una de las características principales de la diabetes de tipo I es la presencia de un infiltrado inflamatorio autoinmune crónico que se sitúa alrededor de los islotes de Langerhans y que progresa a medida que avanza la enfermedad. En este proceso las células no se comportan como entes pasivos sino que al contrario tienen la capacidad de adaptarse a las nuevas condiciones y responder de manera activa al ataque inmunológico (4,5) (Figura 3).

La respuesta de las células a las citocinas proinflamatorias involucra una red compleja de interacciones de genes. El análisis de la expresión génica y del proteoma de la célula ha llevado a la identificación de más de 200 genes que se regulan positiva o negativamente en respuesta a la estimulación con citocinas (37). Los módulos de genes afectados involucran una amplia varie-

dad de funciones celulares que incluyen metabolismo basal, síntesis de proteínas, crecimiento y diferenciación celular, transducción de señales intracitoplasmáticas y mecanismos de defensa y reparación (38) (Figura 3).

La primera evidencia que demuestra la habilidad de la célula para protegerse del ataque autoinmune proviene de experimentos en donde los islotes pancreáticos fueron expuestos a altas dosis de glucosa antes de ser expuestos a dosis letales de ROS. Las células tratadas demostraron ser resistentes a los efectos citotóxicos de los donantes de radicales libres de oxígeno (39). Posteriormente se propuso que el mecanismo de protección inducido por los altos niveles de glucosa se debe a la estimulación del metabolismo de la célula, en particular a la actividad mitocondrial, la cual aumenta la producción de moléculas antioxidantes protegiendo así a la célula. De forma contraria, si la célula se encuentra en reposo es más susceptible al daño oxidativo (40).

La respuesta protectora que desarrollan las células en respuesta a las citocinas probablemente involucre la expresión de moléculas antioxidantes y el bloqueo de vías relacionadas con óxido nítrico (4,20). Tres factores de transcripción están estrechamente relacionados con estos fenómenos: STAT-1, NFκB y p38 MAPK38 (Figura 3). En general, la primera respuesta de la célula al ataque de las citocinas proinflamatorias es la reducción de la síntesis y secreción de insulina. Esto puede ser interpretado como un daño inicial de la célula, pero también puede ser un mecanismo de defensa para redireccionar los recursos metabólicos hacia la protección celular. Las células tratadas con citocinas muestran una menor expresión de PDX-1, transportador de glucosa (GLUT 2) y de proinsulina convertasa 2 (PC2). El PDX-1 es un gen involucrado en la expresión del gen de



la insulina y por lo tanto esencial para la regulación de la función de la célula (41), el GLUT2 está involucrado en la secreción de insulina mediada por glucosa (42), y el PC2 juega un papel fundamental en la regulación de la biosíntesis de insulina (43). Mientras la disminución de la expresión de estos genes hace a la célula menos sensible a la insulina, puede protegerla de los cambios inflamatorios que están ocurriendo (4).

Las células también expresan las proteínas de choque térmico (HSP) en respuesta a las citocinas y tienen la capacidad de neutralizar los efectos del NO y la IL-1 (44,45) (Figura 3). La inducción de la expresión de HSP en células bloquea la translocación de NF- κ B y previene la expresión de iNOS en respuesta a la IL-1 y el IFN- γ (44). Otra proteína antiapoptótica expresada en las células en respuesta a las citocinas es A20, que tiene la capacidad de controlar la producción de iNOS e inhibir la activación de NF- κ B en respuesta a la IL-1 (46). Las citocinas también inducen la expresión de la enzima superóxido dismutasa (SOD), la HSP70, la oxigenasa hem inducible (iHO), y la iNOS en las células (47). Estas moléculas pueden inducir procesos de reducción y así proveen citoprotección contra el estrés oxidativo (4). Las proteínas de choque térmico modulan la expresión de iNOS, combinando propiedades antioxidantes con modulación de NO (44).

Las células desarrollan patrones similares de expresión de genes protectores en respuesta a la hiperglicemia (48). El aumento de la resistencia al daño por ROS se ha asociado con mayores niveles de expresión de la proteína de choque térmico 70 (HSP70), la catalasa y la SOD (49,50).

Células α y específicas

Como se describe en las secciones anteriores, existe evidencia científica sólida que confirma

la habilidad de las células α de responder a la insulinitis y adaptarse a los cambios de su entorno. Sin embargo, si los mecanismos adaptativos son eficientes ¿por qué terminan destruyéndose las células α ?

Fas y su ligando (FasL), son proteínas pertenecientes a la familia FNT, que juega un papel primordial en la inducción de apoptosis celular (51). La unión de Fas con FasL resulta en la apoptosis de las células que expresan Fas por medio de la activación de la vía de las caspasas, lo que conlleva a fragmentación de ADN y posteriormente a muerte celular (52).

Las células α expresan Fas en respuesta al ataque de las células inmunológicas autoreactivas (53). Cuando se implantan islotes pancreáticos en ratones diabéticos o en ratones con insulinitis, las células α son rápidamente atacadas por el infiltrado autoinmune el cual induce la expresión de Fas (54,55). Del mismo modo, Fas se expresa en las células α de los pacientes con diabetes tipo 1. El análisis de biopsias de humanos demostró Fas en células α de islotes con insulinitis mas no en islotes sin insulinitis, lo que sugiere que las células inmunes que infiltran los islotes inducen expresión de Fas en la células α (56). La estimulación con citocinas, NO o glucosa también puede inducir la expresión de Fas (57-59).

La principal fuente celular de FasL parece provenir de las células que conforman la insulinitis ya que se ha detectado gran cantidad de apoptosis en células α localizadas en proximidad a células inmunes que expresan FasL (59). Sin embargo, las células α también pueden expresar FasL60. Los ratones NOD que expresan el transgen para FasL en células α desarrollan una forma acelerada de diabetes (61,62), lo cual confirma que la interacción de estas dos moléculas induce apoptosis de las células α .

Los análisis inmunohistoquímicos han demostrado que las células β viejas, al contrario de las jóvenes, expresan Fas luego de la exposición a células inmunes autoreactivas, hecho que sugiere que la capacidad de expresar Fas se adquiere con el tiempo (62-64). Los estudios en humanos y roedores han demostrado que para que las células β sean destruidas, se necesita que sean estimuladas primero por las moléculas producto de la inflamación. Un estímulo inicial a la célula β con citocinas parece ser crucial para la posterior expresión de Fas en respuesta a estrés. *In vitro*, se ha observado que solo mueren las células β previamente tratadas con citocinas (65, 66). De forma similar, las células T CD4 diabetogénicas matan específicamente a las células que expresan Fas y que hayan sido tratadas con citocinas, pero no tienen efecto sobre las células no tratadas con citocinas o con deficiencia de Fas (67).

De este modo, las células β quedan expuestas a la muerte celular específica mediada por Fas y FasL, de la cual no pueden escapar y terminan por destruirse (5).

Conclusiones

Las células β del páncreas son las únicas células encargadas de producir insulina para posteriormente liberarla al torrente sanguíneo. Durante la progresión de la diabetes de tipo I, las células β son atacadas por células inmunes autoreactivas que terminan por destruirlas e inducir la enfermedad. Hemos descrito en detalle las moléculas producto de la inflamación autoinmune, principalmente la citoquinas proinflamatorias y derivados del oxígeno, que tienen la capacidad de inducir la muerte de las células β de una manera inespecífica.

Una vez la insulinitis se ha instaurado, las células β tienen la capacidad de responder al ataque

inmunológico y desarrollar una respuesta de defensa mediante la cual pueden llegar a obviar el ataque inmunológico inespecífico. Esta respuesta incluye la modificación tanto del metabolismo celular basal como de la expresión de genes y moléculas de defensa celular.

Sin embargo, debido al ataque crónico del infiltrado inflamatorio la célula β termina por expresar Fas, lo cual induce muerte celular específica de la cual no pueden escapar, produciéndose así la muerte de la mayoría de las células β y posteriormente la aparición de los síntomas de la diabetes. El entendimiento de la biología de las células β y su respuesta al ataque inmunológico es indispensable para desarrollar estrategias encaminadas a prevenir, tratar y eventualmente curar la diabetes de tipo I.

Referencias

1. **Gazda LS, Charlton B, Lafferty KJ.** Diabetes results from a late change in the autoimmune response of NOD mice. *J Autoimmun.* 1997;10: 261-70.
2. **Mandrup-Poulsen, T.** Beta cell death and protection. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1005:32-42.
3. **Silva D, Petrovsky N.** Identification of key beta cell gene signaling pathways involved in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1037:203-7.
4. **Eizirik DL, Darville MI.** Beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. *Diabetes* 2001;50 (Suppl 1): S64-9.
5. **Silva DG.** Mechanisms of B-cell apoptosis in type 1 diabetes mellitus. John Curtin School of Medical Research Thesis (Ph.D.)-Australian National University 2004.
6. **Kurrer MO, Pakala SV, Hanson HL, Katz JD.** Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94: 213-8.
7. **Stephens LA, Thomas HE, Ming L, Grell M, Darwiche R, Volodin L, Kay TW.** Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells. *Endocrinology.* 1999;140:3219-27.
8. **Cetkovic-Cvrlje M, Eizirik DL.** TNF-alpha and IFN-



- gamma potentiate the deleterious effects of IL-1 beta on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*.1994;6: 399-406.
9. **Welsh N, Eizirik DL, Sandler S.** Nitric oxide and pancreatic beta-cell destruction in insulin dependent diabetes mellitus: don't take NO for an answer. *Autoimmunity*.1994;18:285-90.
 10. **Rabinovitch A, Suarez WL, Thomas PD, Strynadska K, Simpson I.** Cytotoxic effects of cytokines on rat islets: evidence for involvement of free radicals and lipid peroxidation. *Diabetologia* 1992;35:409-13.
 11. **Kagi D, Odermatt B, Seiler P, Zinkernagel RM, Mak TW, Hengartner H.** Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1997;186:989-97.
 12. **Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng S, Tisch RM, Chen YH.** Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2003;52, 2274-8.
 13. **Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger H.** Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*.1998;95: 2498-502.
 14. **Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC.** Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52:102-10.
 15. **Araki E, Oyadomari S, Mori M.** Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med* 2003; 42:7-14.
 16. **Rabinovitch A, Suárez-Pinzón WL.** Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*.1998;55:1139-49.
 17. **Sternesjo J, Bendtzen K, Sandler S.** Effects of prolonged exposure in vitro to interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha on nitric oxide and insulin production of rat pancreatic islets. *Autoimmunity*.1995;20:185-90.
 18. **Baldeen ME, Neece DJ, Nandi D, Monaco JJ, Gaskins HR.** Interferon-gamma independently activates the MHC class I antigen processing pathway and diminishes glucose responsiveness in pancreatic beta-cell lines. *Diabetes*.1997;46: 770-8.
 19. **Arnush M, Heitmeier MR, Scarim AL, Marino MH, Manning PT, Corbett JA.** IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. *J Clin Invest*. 1998;102:516-26.
 20. **Eizirik DL, Flodstrom M, Karlsen AE, Welsh N.** The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia*.1996;39: 875-90.
 21. **Dunger A, Cunningham JM, Delaney CA, Lowe JE, Green MH, Bone AJ, Green IC.** Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin secretion and cause DNA damage in unweaned-rat islets. Extent of nitric oxide involvement. *Diabetes*.1996; 45:183-9.
 22. **Ishizuka N, Yagui K, Tokuyama Y, Yamada K, Suzuki Y, Miyazaki J, Hashimoto N, et al.** Tumor necrosis factor alpha signaling pathway and apoptosis in pancreatic beta cells. *Metabolism*.1999 ;48:1485-92.
 23. **Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS.** IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for upregulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res*.1998;58:2832-7.
 24. **Suk K, Kim S, Kim YH, Kim KA, Chang I, Yagita H, Shong M, Lee MS.** IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. *J Immunol*. 2001;166:4481-9.
 25. **Foulis AK, Farquharson MA, Hardman R.** Aberrant expression of class II major histocompatibility complex molecules by B cells and hyperexpression of class I major histocompatibility complex molecules by insulin containing islets in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*.1987;30:333-43.
 26. **Walter U, Toepfer T, Dittmar KE, Kretschmer K, Lauber J, Weiss S, Servos G, et al.** Pancreatic NOD beta cells express MHC class II protein and the frequency of I-A(g7) mRNA-expressing beta cells strongly increases during progression to autoimmune diabetes. *Diabetologia*. 2003;46:1106-14.
 27. **Wachlin G, Augstein P, Schroder D, Kuttler B, Klötting I, Heinke P, Schmidt S.** IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. *J Autoimmun*. 2003; 20:303-12.
 28. **Spinas GA.** The Dual Role of Nitric Oxide in Islet beta-Cells. *News Physiol Sci*.1999;14:49-54.
 29. **Brown GC.** Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta*.1999;1411:351-69.
 30. **Suárez-Pinzón WL, Szabo C, Rabinovitch A.** Development of autoimmune diabetes in NOD mice is associated with the formation of peroxynitrite in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes*.1997;46: 907-11.
 31. **Hoeldtke RD, Bryner KD, McNeill DR, Warehime SS, Van Dyke K, Hobbs G.** Oxidative stress and

- insulin requirements in patients with recent-onset type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:1624-8.
32. **Mandrup-Poulsen T, Corbett JA, McDaniel ML, Nerup J.** What are the types and cellular sources of free radicals in the pathogenesis of type 1 (insulindependent) diabetes mellitus? *Diabetologia.* 1993; 36:470-1.
 33. **Suárez-Pinzón WL, Strynadka K, Rabinovitch A.** Destruction of rat pancreatic islet beta-cells by cytokines involves the production of cytotoxic aldehydes. *Endocrinology.* 1996;137: 5290-6.
 34. **Tyrberg B, Andersson A, Borg LA.** Species differences in susceptibility of transplanted and cultured pancreatic islets to the beta-cell toxin alloxan. *Gen Comp Endocrinol.* 2001;122: 238-51.
 35. **Eizirik DL, Pipeleers DG, Ling Z, Welsh N, Hellerstrom C, Andersson A.** Major species differences between humans and rodents in the susceptibility to pancreatic beta-cell injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:9253-6.
 36. **Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M.** Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 1996;20: 463-6.
 37. **Cardozo AK, Kruhoffer M, Leeman Orntoft T, Eizirik DL.** Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes.* 2001;50: 909-20.
 38. **Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T.** A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia.* 2001;44:2115-33.
 39. **Pipeleers D, Van de Winkel M.** Pancreatic B cells possess defense mechanisms against cell-specific toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:5267-71.
 40. **Pipeleers D, Hoorens A, Marichal-Pipeleers M, Van de Castele M, Bouwens L, Ling Z.** Role of pancreatic beta-cells in the process of beta-cell death. *Diabetes.* 2001;50 Suppl 1:S52-7.
 41. **Melloul D, Marshak S, Cerasi E.** Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia.* 2002; 45: 309-26.
 42. **Thorens B.** GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol Membr Biol.* 2001; 18: 265-73.
 43. **Steiner DF, Rouille Y, Gong Q, Martin S, Carroll R, Chan SJ.** The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes Metab.* 1996;22:94-104..
 44. **Scarim AL, Heitmeier MR, Corbett JA.** Heat shock inhibits cytokineinduced nitric oxide synthase expression by rat and human islets. *Endocrinology.* 1998;139, 5050-7.
 45. **Eizirik DL, Welsh M, Strandell E, Welsh N, Sandler S.** Interleukin-1 beta depletes insulin messenger ribonucleic acid and increases the heat shock protein hsp70 in mouse pancreatic islets without impairing the glucose metabolism. *Endocrinology.* 1990;127: 2290-7.
 46. **Grey ST, Arvelo MB, Hasenkamp W, Bach FH, Ferran C.** A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets. *J Exp Med.* 1999;190:1135-46.
 47. **Ling Z, Van de Castele M, Eizirik DL, Pipeleers DG.** Interleukin-1betainduced alteration in a beta-cell phenotype can reduce cellular sensitivity to conditions that cause necrosis but not to cytokine-induced apoptosis. *Diabetes.* 2000;49:340-5.
 48. **Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, et al.** Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes.* 2002;51:413-23. .
 49. **Eizirik DL.** Beta-cell defence and repair mechanisms in human pancreatic islets. *Horm Metab Res.* 1996; 28: 302-5.
 50. **Welsh N, Margulis B, Borg LA, Wiklund HJ, Saldeen J, Flodstrom M, Mello MA, et al.** Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Mol Med.* 1995;1:806-20.
 51. **Mountz JD, Zhang HG, Hsu HC, Fleck M, Wu J, al-Maini MH, Zhou T.** Apoptosis and cell death in the endocrine system. *Recent Prog Horm Res.* 1999;54:235-68; discussion 269. Review.
 52. **Magnusson C, Vaux DL.** Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol Cell Biol.* 1999;77: 41-6.
 53. **Meinhardt A, Bacher M, Metz C, Bucala R, Wrexford N, Lan H, Atkins R, Hedger M.** Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biol Reprod.* 1998;59:371-8.
 54. **Walter U, Franzke A, Sarukhan A, Zober C, von Boehmer H, Buer J, Lechner O.** Monitoring gene expression of TNFR family members by beta-cells during development of autoimmune diabetes. *Eur J Immunol.* 2000;30:1224-32. Erratum in: *Eur J Immu-*



- nol. 2003 Jul;33(7):2064. Frantzke A [corrected to Frantzke A].
55. **Suárez-Pinzón W, et al.** Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. *Diabetes*. 1999;48: 21-8.
 56. **Moriwaki M, Itoh N, Miyagawa J, Yamamoto K, Imagawa A, Yamagata K, Iwahashi H, et al.** Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999;42:1332-40.
 57. **Yamada K, Takane-Gyotoku N, Yuan X, Ichikawa F, Inada C, Nonaka K.** Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. *Diabetologia*. 1996;39: 1306-12.
 58. **Stassi G, Todaro M, Richiusa P, Giordano M, Mattina A, Sbriglia MS, Lo Monte A, et al.** Expression of apoptosis-inducing CD95 (Fas/Apo-1) on human beta-cells sorted by flow-cytometry and cultured in vitro. *Transplant Proc*. 1995;27:3271-5.
 59. **Stassi G, De Maria R, Trucco G, Rudert W, Testi R, Galluzzo A, Giordano C, Trucco M.** Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med*. 1997;186:1193-200.
 60. **Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N, Donath MY.** Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*. 2001;50:1683-90.
 61. **Silva DG, Petrovsky N, Socha L, Slattery R, Gattenby P, Charlton B.** Mechanisms of accelerated immune-mediated diabetes resulting from islet beta cell expression of a Fas ligand transgene. *J Immunol*. 2003;170:4996-5002.
 62. **Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA Jr, Matis LA.** The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell*. 1997;89:17-24.
 63. **Ingelsson E, Saldeen J, Welsh N.** Islet expression of perforin, Fas/Apo-1 and interleukin-1 converting enzyme (ICE) in non-obese diabetic (NOD) mice. *Immunol Lett*. 1998;63: 125-9.
 64. **Augstein P, Wachlin G, Berg S, Bahr J, Salzsieder C, Hehmke B, Heinke P, Salzsieder E.** Surface and intracellular Fas expression associated with cytokine-induced apoptosis in rodent islet and insulinoma cells. *J Mol Endocrinol*. 2003;30:163-71.
 65. **Loweth AC, Watts K, McBain SC, Williams GT, Scarpello JH, Morgan NG.** Dissociation between Fas expression and induction of apoptosis in human islets of Langerhans. *Diabetes Obes Metab*. 2000;2:57-60.
 66. **Loweth AC, Williams GT, James F, Scarpello JH, Morgan NG.** Human islets of Langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1beta and Fas ligation. *Diabetes*. 1998;47:727-32.
 67. **Amrani A, Verdaguer J, Thiessen S, Bou S, Santamaria P.** IL-1alpha, IL-1beta, and IFN-gamma mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4 (+) T lymphocytes. *J Clin Invest*. 2000;105, 459-68.