



El efecto del IFN α en la autofagia de las células α y β pancreáticas en la diabetes tipo 1

María Martínez Cuenca

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo de Fin de Máster

Curso 2023-2024

Tutora: Dra. Laura Marroquí Esclapez

Co-tutor: Dr. Reinaldo Sousa dos Santos

D^a LAURA MARROQUÍ ESCLAPEZ, Doctora y Profesora Permanente Laboral del área de Fisiología del Departamento de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández de Elche y **D. REINALDO SOUSA DOS SANTOS** Investigador Miguel Servet, Hospital General Universitario de Elche/FISABIO

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

“El efecto del IFN α en la autofagia de las células α y β pancreáticas en la diabetes tipo 1”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

MARÍA MARTÍNEZ CUENCA

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche, cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a fecha de

1. RESUMEN

La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune crónica que representa aproximadamente el 5% de todos los casos de diabetes. Esta patología se caracteriza por la falta casi total de generación de insulina endógena, que ocurre como consecuencia de la destrucción irreversible de aproximadamente el 80% de la masa funcional de células β del páncreas endocrino, provocada por un ataque inmunológico autorreactivo. Se ha establecido que los IFN tipo I (IFN-I), citoquinas que actúan como un vínculo entre los factores genéticos y ambientales que desencadenan la DT1 y que son clave para las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas están implicadas en las primeras etapas de la DT1. Se ha descrito que el IFN α está implicado en la inducción de estrés en el RE, que se ha definido como una de las causas que conduce a la apoptosis de las células β . En este contexto hallazgos recientes indican que el estrés del RE potencia la activación de la autofagia. La autofagia es esencial para mantener la homeostasis de las células β y ha sido identificado como un regulador crítico en la función de estas células tanto en modelos de ratones diabéticos como en pacientes con DT2.

Resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran una expresión diferencial de genes relacionados con la autofagia en células α y β aisladas de ratón tras el tratamiento con IFN α . En base a estos resultados preliminares, en este Trabajo de Fin de Máster se ha estudiado el papel de la autofagia tras la exposición a IFN α tanto en líneas celulares de células β (MIN-6) como en células α (α TC1-9). Para ello se usaron tratamiento con compuestos moduladores de la autofagia (bafilomicina A1, cloroquina y rapamicina) en combinación con IFN α y, posteriormente, se analizaron proteínas relacionadas con la autofagia (LC3-II y p62) por western blot e inmunofluorescencia y el efecto de la modulación de la autofagia sobre la viabilidad celular. Nuestros resultados sugieren que el IFN α provoca un bloqueo del flujo autofágico en células α TC1-9, sin embargo, no ejerce un efecto relevante en MIN-6. El ensayo de viabilidad celular indica que la inhibición del flujo autofágico en células α pancreáticas con bafilomicina A1 y cloroquina aumentó la apoptosis, un efecto ligeramente incrementado por la exposición a IFN α . El tratamiento con rapamicina también aumentó la apoptosis, tanto en condiciones basales como con IFN α , pero en menor medida que los inhibidores del flujo autofágico. En células β pancreáticas, la inhibición del flujo autofágico con bafilomicina A1 redujo la viabilidad e indujo apoptosis, mientras que la cloroquina provocó la muerte del 100 % de las células MIN-6, independientemente del tratamiento con IFN α . La rapamicina aumentó ligeramente la apoptosis en condiciones basales, pero con IFN α la disminuyó ligeramente respecto al control.

Palabras clave: diabetes tipo 1, autofagia, IFN α , células α , células β

Abstract

Type 1 diabetes (T1D) is a chronic autoimmune disease that represents approximately 5% of all diabetes cases. This condition is characterized by an almost total lack of endogenous insulin production, which occurs as a result of the irreversible destruction of about 80% of the functional mass of β -cells in the endocrine pancreas due to an autoimmune attack. It has been established that type I interferons (IFN-I), cytokines that act as a link between genetic and environmental factors that trigger T1D and are key to both innate and adaptive immune responses, are involved in the early stages of T1D. IFN α has been implicated in inducing endoplasmic reticulum (ER) stress, which has been identified as a trigger for β -cell apoptosis. In this context, recent findings indicate that ER stress enhances autophagy. Autophagy is essential for β -cell homeostasis and has been identified as a critical regulator of β -cell function in both diabetic mouse models and patients with type 2 diabetes (T2D).

Preliminary results from our laboratory show differential expression of autophagy-related genes in α and β -cells from mice after treatment with IFN α . Based on these preliminary results, this TFM studied the role of autophagy after exposure to IFN α in both β -cell lines (MIN-6) and α -cell lines (α TC1-9). For this purpose, treatments with autophagy-modulating compounds (bafilomycin A1, chloroquine, and rapamycin) were used in combination with IFN α , and subsequently, autophagy-related proteins (LC3-II and p62) were analyzed by western blot and immunofluorescence, as well as the effect of autophagy modulation on cell viability. Our results suggest that IFN α causes a blockage of autophagic flux in α TC1-9 cells; however, it does not have a notable impact on MIN-6 cells. The cell viability assay indicates that inhibition of autophagic flux in pancreatic α -cells with bafilomycin A1 and chloroquine increased apoptosis, an effect slightly enhanced by exposure to IFN α . Treatment with rapamycin also increased apoptosis, both under basal conditions and with IFN α , but not as significantly as autophagic flux inhibitors. In pancreatic β -cells, inhibition of autophagic flux with bafilomycin A1 reduced viability and induced apoptosis, while chloroquine caused 100% death of MIN-6 cells, regardless of IFN α treatment. Rapamycin slightly increased apoptosis under basal conditions but decreased it slightly with IFN α compared to the control.

Keywords: Type 1 diabetes, autophagy, IFN α , α cells, β cells

Abreviaturas

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP

ATG: Genes relacionados con la autofagia

BSA: Albúmina de suero bovino

CXCL10: Ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C

DT1: Diabetes Tipo 1

DT2: Diabetes Tipo 2

FACS: Clasificador de Células Activadas por Fluorescencia

HLA-I: Antígeno Leucocitario Humano clase I

Hsc70: Proteína chaperona de choque térmico de 70 kDa

ICF: Inmunitofluorescencia

IFN-I: Interferón tipo I

IFN α : Interferón alfa

IFN γ : Interferón γ

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina 6

LC3: Cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos

mTOR: Diana de rapamicina en células de mamífero

mTORC1: Complejo de mTOR 1

NOD: Ratón diabético no obeso

PE: Fosfatidiletanolamina

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III

RE: Retículo endoplasmático

RNA-seq: Secuenciación de ARN

SQSTM1: Sequestosoma 1

TFS: Tampón salino fosfato

TNF- α : Factor necrosis tumoral α

ULK1/2: Quinasa Activadora de Autofagia Similar a Unc-51 1/2

UPR: Respuesta a proteínas desplegadas

V-ATPasas: H⁺-ATPasas de tipo vacuolar

TBS-T: Solución salina tamponada con Tris y Tween 20

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
Abstract	4
Abreviaturas	5
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	7
2.1. El páncreas endocrino	7
2.2. Etiología de la diabetes	8
2.3. La autofagia	13
2.3.1. Tipos de autofagia	14
2.3.2. Maquinaria molecular de la autofagia	16
2.3.3. La autofagia de células α y β pancreáticas en la DT1	19
2.4. Resultados preliminares RNA-seq	22
3. OBJETIVOS	24
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	25
4.1. Manejo y uso de líneas celulares	25
4.2. Preparación de los compuestos y tratamientos	26
4.3. Western blot	26
4.4. Inmunocitofluorescencia	28
4.5. Evaluación de la viabilidad celular	29
4.6. Análisis estadístico	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Estudio del flujo autofágico	31
5.2. El tratamiento con IFNα no indujo diferencias adicionales al co-tratarse con moduladores de la autofagia en MIN-6 y αTC1-9	34
5.3. El IFNα provoca un bloqueo en el flujo autofágico en αTC1-9 pero no en MIN-6	37
5.4. El IFNα disminuyó la acumulación de LC3 en αTC1-9 pero no en MIN-6	42
5.5. Estudio del efecto la modulación de la autofagia tras la exposición a IFNα en la viabilidad celular de células αTC1-9 y MIN-6	43
6. DISCUSIÓN	45
7. CONCLUSIONES	52
8. BIBLIOGRAFÍA	53

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. El páncreas endocrino

El páncreas es una glándula secretora que desempeña un papel esencial para el metabolismo, funcionando tanto a nivel endocrino como exocrino. Por un lado, el páncreas exocrino está compuesto predominantemente por parénquima exocrino, el cual está constituido por células acinares que producen y liberan enzimas digestivas inactivas. Por otro lado, un pequeño porcentaje del páncreas, aproximadamente un 2% de su masa total, consiste en el páncreas endocrino, el cual se encarga de la regulación de la homeostasis de la glucosa en el organismo mediante la secreción principalmente de las hormonas insulina y glucagón (Röder et al., 2016).

Dentro del tejido exocrino del páncreas, encontramos microestructuras endocrinas especializadas denominadas islotes de Langerhans. Se ha estimado que el páncreas humano alberga aproximadamente un millón de islotes pancreáticos, con un diámetro promedio de 130 μm , compuesto entre 1000 y 2500 células (Rorsman & Braun, 2013). En cambio, un análisis realizado con tomografía de proyección óptica estimó que un ratón de 8 semanas albergaba aproximadamente 1100 islotes pancreáticos, cada uno con un diámetro promedio de aproximadamente 60 μm . De este modo, se determinó que un islote promedio de ratón contenía aproximadamente 80 células (Alanentalo et al., 2007).

En los islotes pancreáticos, existen principalmente cinco tipos de células especializadas en la secreción de hormonas del sistema endocrino implicadas en el metabolismo de la glucosa. Éstas son: las células β que constituyen entre el 50 % y el 80 % del total de células de islotes, dependiendo del modelo animal, productoras de insulina; las células α , encargadas de la producción de glucagón (entre el 10 % y el 40 %); las células γ que secretan polipéptido pancreático; las células δ las cuáles producen somatostatina; y, por último, las células ϵ que generan grelina (**Figura 1**) (Dolenšek et al., 2015; In't Veld & Marichal, 2010). Es importante mencionar que las hormonas secretadas por los tipos celulares mayoritarios (células α y células β) desempeñan funciones antagónicas en la regulación de la glucemia. Cuando los niveles de glucosa en sangre (o glucemia) son bajos, como durante el ayuno o entre comidas, el glucagón aumenta la glucemia. De manera contraria, durante la alta glucemia, como después de la ingesta de comidas, especialmente tras consumir carbohidratos, la insulina reduce los niveles de glucosa en sangre. Por su parte, la somatostatina inhibe la liberación tanto de glucagón como de insulina y el polipéptido pancreático regula tanto la actividad de secreción exocrina como endocrina del páncreas. En conjunto, estas hormonas mantienen la homeostasis de la glucosa en vertebrados (Rorsman & Ashcroft, 2018; Suckale & Solimena, 2008).

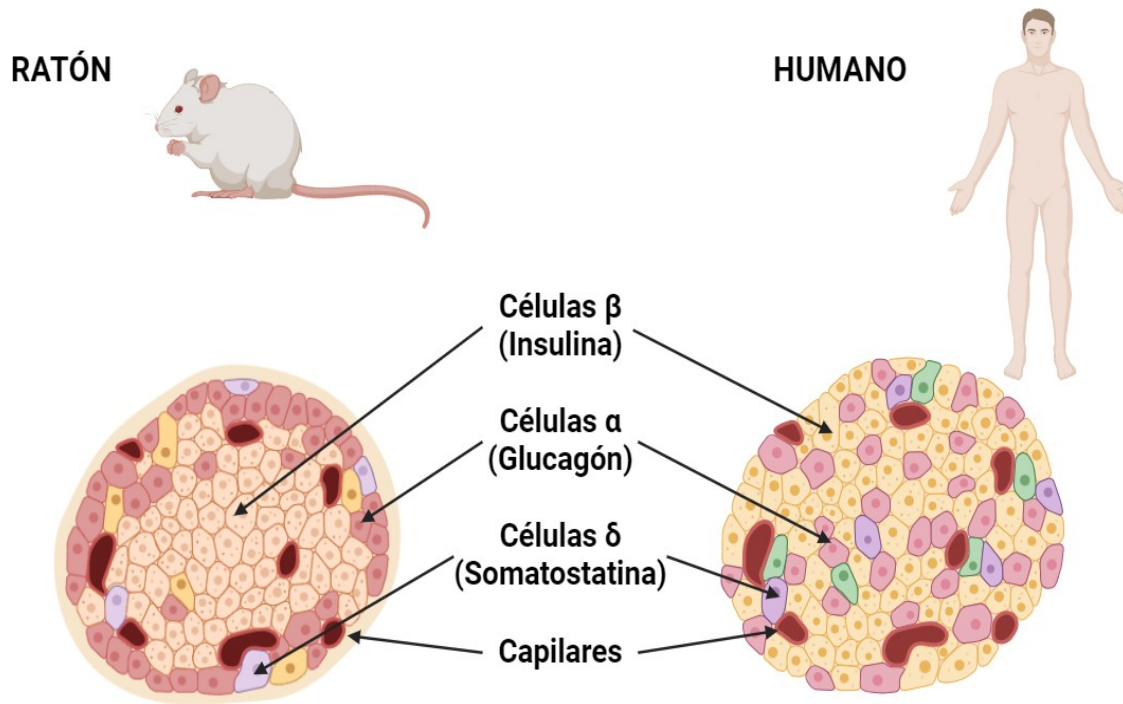


Figura 1. Comparación de la composición y citoarquitectura del islote de Langerhans entre ratón (parte izquierda) y humano (parte derecha). Este esquema muestra los distintos tipos celulares presentes en el islote y la hormona principal que secretan. Figura realizada con Biorender.

Entre estos tipos celulares previamente mencionados, las células α y β destacan como actores clave en la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Las células α , productoras de glucagón y las células β , responsables de la síntesis y liberación de insulina, desempeñan roles complementarios y cruciales en el sistema endocrino. Por un lado, las células β pancreáticas regulan la expresión y transcripción del gen *INS* en respuesta a señales de glucosa y de insulina autocrina (Tokarz et al., 2018). Por otro lado, en las células α pancreáticas la producción de glucagón ocurre a través del procesamiento del preproglucagón (Schroeder et al., 1984). La principal función de esta respuesta contrarreguladora es prevenir la hipoglucemia, una condición que se ve alterada en individuos con diabetes (Da Silva Xavier, 2018). De este modo, la sincronización entre la liberación de glucagón e insulina determina el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa. Por tanto, comprender en profundidad el funcionamiento de estas células es esencial para abordar enfermedades como la diabetes tipo 1 (DT1) y la diabetes tipo 2 (DT2).

2.2. Etiología de la diabetes.

La diabetes mellitus o simplemente diabetes es un conjunto de afecciones metabólicas crónicas que se caracterizan por niveles elevados de glucosa en la sangre, fenómeno denominado hiperglucemia. Estas enfermedades se desencadenan ya sea por una producción deficiente de insulina por el páncreas, la resistencia a la acción de la insulina por parte de las células del

organismo, o por una combinación de ambos factores (Atkinson et al., 2014). Según la estimación de la Federación Internacional de Diabetes en el año 2021, el número de individuos afectados por diabetes fue de aproximadamente 537 millones de adultos (entre 20 y 79 años). Esta enfermedad fue la causa de más de 6.7 millones de fallecimientos en personas de este rango de edad. A su vez, distintas investigaciones apuntan que el número de individuos afectados por la diabetes en todo el mundo aumentará a 783 millones para el año 2045 (IDF, 2022).

La progresión de la diabetes sin tratamiento es una enfermedad letal, ya que la hiperglucemia crónica conlleva un alto riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares que incluyen la enfermedad coronaria, la enfermedad cerebrovascular y la enfermedad arterial periférica, así como daños severos a nivel microvascular, como la nefropatía, la retinopatía, la neuropatía y las úlceras del pie diabético. Además, se estima que 541 millones de personas presentan un riesgo elevado de desarrollar diabetes (Prasad et al., 2023).

Según su etiología, la diabetes puede clasificarse en dos tipos principales: la DT1 y DT2. La DT2 es la forma más común de diabetes, representando entre el 90% y el 95% de todos los casos (IDF, 2022). La DT2 está causada por una resistencia a la insulina en los órganos diana y una disfunción progresiva de las células β pancreáticas. Los principales factores de riesgo que se han establecido para desarrollar esta patología son un estilo de vida sedentario y un consumo excesivo de azúcares y grasas (Chatterjee et al., 2017). Por otro lado, la DT1 es una enfermedad crónica de origen autoinmune que se caracteriza por la inflamación de los islotes pancreáticos (insulinitis) y la consecuente destrucción específica de las células β pancreáticas por el ataque del sistema inmunológico. Como resultado, esta condición da lugar a una producción muy limitada o inexistente de insulina endógena. Cabe destacar que las personas diagnosticadas con DT1 representan entre el 5% y 10% del total de diabéticos a nivel mundial (IDF, 2022). En la actualidad, la DT1 no tiene cura y su tratamiento consiste en la administración continua de insulina exógena a lo largo de toda la vida del individuo (Atkinson et al., 2014). En este Trabajo Final de Máster, nos centraremos en abordar la DT1.

Como se ha mencionado anteriormente, la DT1 se caracteriza por un ataque autoinmune que ataca selectivamente a las células β pancreáticas, generalmente antes de los 18 años de edad. En la DT1, los síntomas clínicos aparecen una vez que aproximadamente el 80% de la función/masa de células β se ha perdido de manera permanente. La predisposición de sufrir DT1 está estrechamente relacionada con los antecedentes genéticos de un individuo. De este modo, distintos estudios de GWAS han apuntado que existen más de 50 polimorfismos de un solo nucleótido (o SNPs) vinculados con el riesgo de padecer DT1 (Santin & Eizirik, 2013). Los SNPs que

muestran una fuerte correlación con la DT1 pueden señalar regiones del genoma que contienen genes candidatos que se consideran potencialmente relacionados con el desarrollo de la enfermedad. Se ha descrito que en torno a un 80% de estos genes candidatos se expresan en las células β pancreáticas humanas. Por tanto, estos genes que regulan vías críticas en las células β , como las respuestas antivirales, la inmunidad innata y la activación de la apoptosis podrían contribuir al desarrollo de la DT1 (Marroqui, Dos Santos, et al., 2015; Størling & Pociot, 2017). A pesar de que se ha establecido que los factores genéticos tienen un papel significativo en el desarrollo de la DT1, se ha determinado que las tasas de concordancia entre gemelos idénticos para el desarrollo de esta enfermedad son solo aproximadamente del 40%. Esto sugiere que los factores ambientales también son fundamentales en la manifestación de la enfermedad (Jun & Yoon, 2003).

En la actualidad, no se ha establecido una causa definitiva sobre cómo se desarrolla la DT1. La hipótesis más aceptada para comprender los mecanismos que conducen a la destrucción de células β por el ataque autoinmune es que surge un “diálogo” inapropiado entre las células del sistema inmunológico que invaden los islotes y las células β del páncreas, influenciado por factores genéticos y ambientales. Si individuos genéticamente predispuestos entran en contacto con determinados factores ambientales (p. ej. Infecciones virales), se desencadenará la enfermedad. Este proceso conduce a la inflamación de los islotes (insulitis) y en última instancia a la destrucción de las células β pancreáticas, lo que aumentaría la producción y liberación tanto de citoquinas como de quimioquinas proinflamatorias. La liberación de citoquinas desencadena una cascada de eventos inmunitarios que resultan en la destrucción de las células β , mientras que las quimioquinas funcionan como quimioatrayentes para la infiltración de las células del sistema inmunológico hacia el islote pancreático (Eizirik & Colli, 2020; Marroqui et al., 2021).

Epidemiológicamente, estudios clínicos y patológicos en humanos apoyan una fuerte asociación entre las infecciones virales y la DT1. Cabe destacar que existe una amplia evidencia de que un factor de riesgo para el desarrollo de la DT1 es la infección por enterovirus especialmente el virus Coxsackie B, durante una etapa temprana de la vida. Estos virus de ARN monocatenario y sentido positivo pertenecen a la familia *Picornaviridae* y se replican preferentemente en las mucosas respiratoria e intestinal. Se han realizado distintos estudios a largo plazo con el propósito de investigar cómo las infecciones causadas por enterovirus podrían contribuir al inicio de la autoinmunidad en los islotes pancreáticos en la DT1. En este contexto, un estudio realizado por Krogvold et al. en 2015 reveló la presencia de VP1 en los islotes de los individuos con DT1, así como la identificación de secuencias específicas de ARN de enterovirus en el 67% de estos pacientes (Krogvold et al., 2015). A su vez, se ha descrito que los individuos en riesgo de desarrollar esta enfermedad a menudo presentan un patrón específico de expresión de genes clásicamente

inducidos por interferón (IFN) tipo I (IFN-I) (Ferreira et al., 2014; Kallionpää et al., 2014). En personas susceptibles de padecer DT1, se ha observado que incluso después de que la infección viral haya sido controlada, persiste una activación anormal de la señalización de IFN-I. Esta "huella de IFN-I" es, por lo tanto, un marcador de riesgo y de procesos patológicos subyacentes que preceden y acompañan la destrucción autoinmune de las células β en la DT1 (Ferreira et al., 2014) (**Figura 2**).

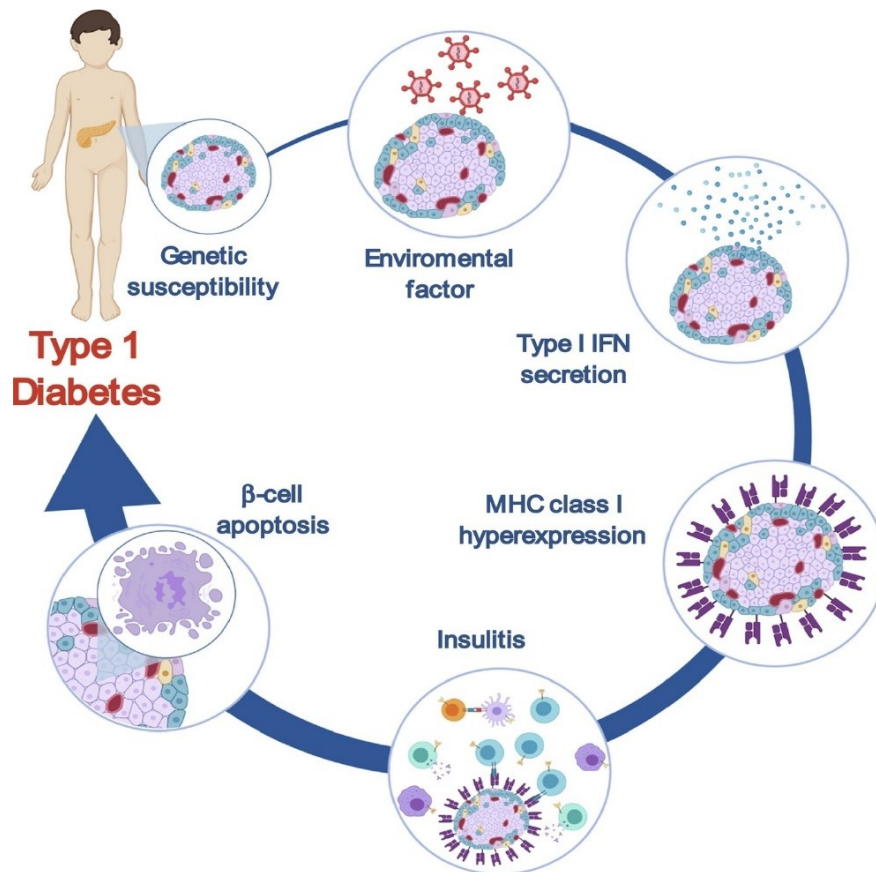


Figura 2. Sucesión de eventos propuesta para el desarrollo de la DT1. En individuos con predisposición genética, una infección viral durante la niñez puede causar una infección leve pero persistente en las células β . Esto incrementa la producción y/o liberación de IFN-I, activando la producción de IFNs y la expresión del MHC clase I. Esta serie de sucesos resultan en inflamación entorno a los islotes (insulinitis) y conducen a la apoptosis de las células β , lo que causará en última instancia la aparición de DT1. Figura extraída de: Marroqui et al., 2021.

Por otro lado, en la fisiopatología de la DT1 no solo está involucrada la secreción insuficiente de insulina por las células β , sino también la secreción inadecuada de glucagón por las células α pancreáticas (Brissova et al., 2018). Aunque el sistema inmunológico destruye de forma específica a las células β , ambos tipos celulares son disfuncionales. La disfunción de las células α y la alteración en la secreción de glucagón contribuyen a la hiperglucemia y a la desregulación metabólica, que puede incluso preceder a la disfunción y muerte de las células β (Doliba et al., 2022; Martínez et al., 2021). Se ha descrito que las células α tienen un mejor manejo de las infecciones virales y del estrés del retículo endoplasmático (RE), lo que les permite sobrevivir mejor en situaciones de estrés que pueden causar la muerte celular (Eizirik et al., 2023; Martínez et al., 2021). Se ha demostrado que

las células α tienen una expresión basal de genes antivirales mayor que las células β , en concreto genes regulados por STAT1, lo que les permite responder de manera más eficiente a las infecciones virales. Por lo tanto, es más probable que una infección viral se establezca en las células β , lo que desencadena un ataque del sistema inmunológico contra estas células (Marroqui, Lopes, et al., 2015).

De este modo, se ha planteado que ambos tipos celulares podrían estar involucrados en las etapas iniciales de la enfermedad. En primer lugar, las células β son el objetivo de las células T CD8⁺ que provocan su destrucción a través del reconocimiento de péptidos autoantigénicos asociados con HLA-I (Antígeno Leucocitario Humano clase I). La hiperexpresión de HLA-I es característica en la DT1, ya que se ha observado esta hiperexpresión en los islotes de donantes con DT1 (Richardson et al., 2016). Cabe destacar que, aunque el sistema inmunológico no ataca a las células α , el HLA-I se expresó principalmente en este tipo celular (Benkahla et al., 2021). A su vez, se ha demostrado que CXCL10 (Ligando 10 de quimiocina con motivo C-X-C), una quimioquina que es producida por células de los islotes pancreáticos en respuesta al estrés inflamatorio se expresa también en células α (además de células β) tanto en ratones NOD (ratón diabético no obeso) como en pacientes con DT1 (Nigi et al., 2020). También se ha descrito que las células α pueden expresar IL-1 β (interleucina-1 β) (Anquetil et al., 2017), así como IL-6 (interleucina 6) (Rajendran et al., 2020) contribuyendo al microambiente proinflamatorio de los islotes y provocando que los linfocitos T se dirijan al páncreas en la DT1. Estos hallazgos destacan el papel de las células α en la patogénesis y progresión de la DT1 y sugieren la importancia de profundizar en nuestro entendimiento sobre la función y disfunción de estas células en la autoinmunidad de los islotes pancreáticos.

Los IFN de tipo I son una clase de citoquinas implicadas en la respuesta inmunitaria innata antiviral. Dentro de este tipo de IFNs, en este Trabajo de Fin de Máster nos centraremos en describir el IFN α , ya que se ha descrito que esta citoquina está implicada en la inducción de estrés del RE, la insulinitis y la hiperexpresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I (la proteína codificada por el gen HLA) en las células β , causas que facilitan el reconocimiento autoinmune por las células T CD8⁺ (Marroqui et al., 2017). La asociación de la expresión sostenida de MHC clase I con el estrés del RE y con modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales, podría conducir a una presentación sostenida de neoantígenos al sistema inmunitario, que facilitarían en última instancia la destrucción de las células β (Coomans de Brachène et al., 2024). Estos hallazgos sugieren que el IFN α desempeña un papel importante en la patogénesis de las primeras etapas de la DT1. Además, varios genes candidatos para la DT1 como como *MDA5*, *TYK2* y *PTPN2* expresados en células β participan en la respuesta al IFN (Santin & Eizirik, 2013) (**Figura 3**).

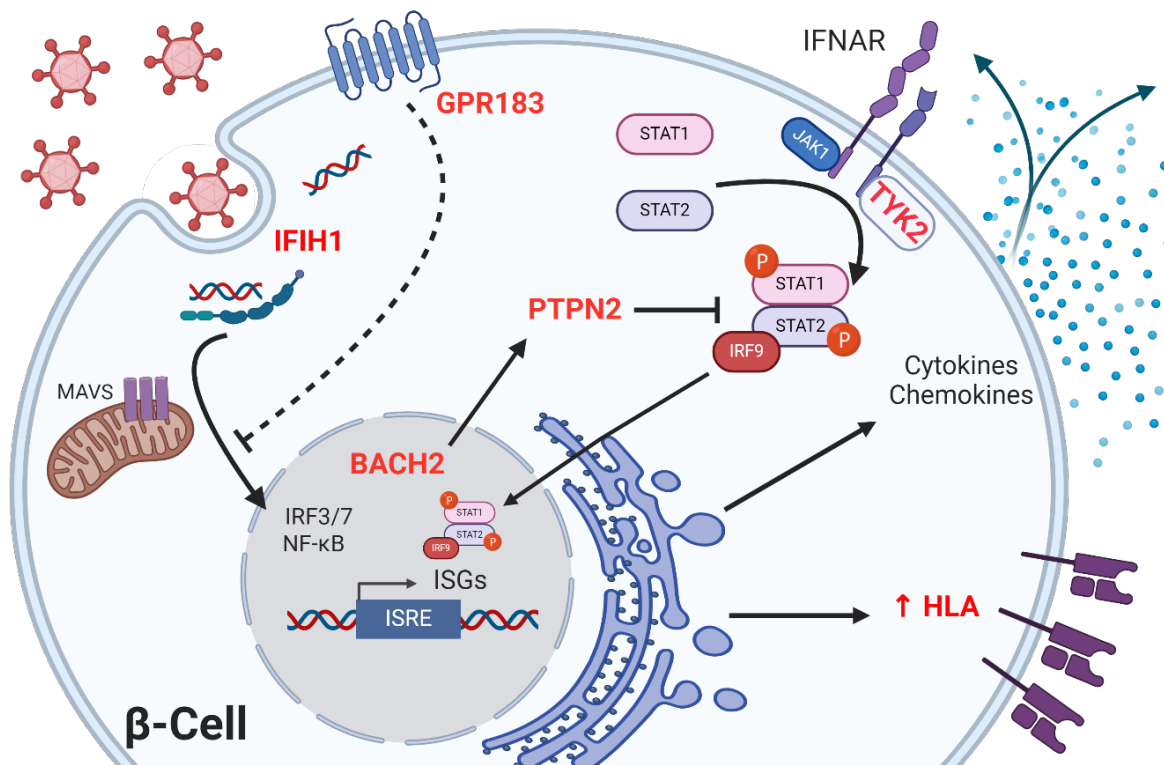


Figura 3. Genes candidatos para la DT1 relacionados con la vía de IFN tipo I en células β pancreáticas. En rojo se resaltan los genes candidatos para la DT1 expresados en células β y su posible papel en la infección viral que podría desencadenar la DT1. Estos genes están involucrados en todos los procesos que se llevan a cabo en la célula β , como reconocimiento de virus, señalización y amplificación de IFN y reconocimiento de células β por parte del sistema inmunológico. Figura extraída de: Marroqui et al., 2021.

2.3. La autofagia

El término "autofagia" proviene originalmente del griego y significa "comerse a uno mismo". La autofagia es un proceso de autodigestión llevado a cabo mediante un mecanismo complejo de degradación lisosomal. Este fenómeno está altamente conservado en todos los organismos eucariotas, desde organismos unicelulares como las levaduras hasta organismos pluricelulares como las células de mamíferos (Levine & Klionsky, 2017). Aquí nos enfocaremos en la descripción del proceso de autofagia en las células de mamíferos.

Este proceso fue descrito por primera vez por Christian de Duve en 1963, tras la identificación de vesículas en el citoplasma celular que encapsulaban a proteínas y orgánulos celulares y los dirigían hacia los lisosomas para su degradación (De Duve & Wattiaux, 1966). No obstante, en los últimos años se ha avanzado significativamente en la comprensión de la regulación del proceso de autofagia, así como en las funciones que desempeña en la célula y en las consecuencias de su disfunción (Hubert et al., 2022).

La autofagia es un proceso catabólico mediante el cual las células degradan orgánulos, proteínas y macromoléculas y llevan a cabo su posterior reciclaje mediante la acción del lisosoma, con el fin principal de mantener la homeostasis celular y generar energía. De este modo, este mecanismo permite desechar tanto proteínas como orgánulos que han sufrido algún tipo de deterioro o bien han envejecido y pueden ser tóxicos para la célula. Este proceso se induce de manera constitutiva a un nivel bajo de intensidad en todas las células del organismo, contribuyendo a la renovación continua de componentes intracelulares. Es un mecanismo requerido desde las primeras etapas del desarrollo hasta el envejecimiento de un organismo eucariota. Además, la autofagia interviene en la diferenciación celular y en la regeneración de los tejidos (Liao et al., 2021). Por otro lado, la autofagia se induce en respuesta a condiciones desfavorables como el estrés ambiental, periodos de falta de nutrientes o factores de crecimiento y la invasión de patógenos (Parzych & Klionsky, 2014). Cabe mencionar que la alteración de la autofagia se ha relacionado con patologías tales como el cáncer, trastornos metabólicos, enfermedades hepáticas y cardiovasculares, entre otras (Cao et al., 2021). Asimismo, estudios recientes han evidenciado que la disfunción de la autofagia está asociada con la patogénesis de la DT1 y DT2 (Yasasilka & Lee, 2024).

2.3.1. Tipos de autofagia

Se han identificado tres tipos principales de autofagia que son comunes en la mayoría de las células: la macroautofagia (conocida comúnmente como “autofagia” al ser la más estudiada), la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. Aunque cada tipo presenta características morfológicas distintas, todos comparten el proceso final de traslación de la carga citoplasmática al lisosoma donde se lleva a cabo su descomposición. Los componentes macromoleculares que se han generado vuelven de nuevo al citosol, donde se lleva a cabo su reutilización y reciclaje (Kirchner et al., 2019).

Con respecto a la macroautofagia, ésta es una vía catabólica de degradación masiva, cuya maquinaria central está mediada por un conjunto de genes altamente conservados a lo largo de la evolución denominados ATG (“Autophagy related genes”). El proceso comienza con la formación de una estructura primaria denominada fagoforo o membrana de aislamiento, que se expande para formar el autofagosoma, una vesícula de doble membrana que secuestra la carga citoplasmática, que es el material encapsulado por esta vesícula. Posteriormente, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana del lisosoma, donde ocurre la descomposición de la membrana interna del autofagosoma y su contenido mediante la acción de enzimas hidrolíticas. Este compartimento donde ocurre el proceso de degradación se denomina autolisosoma (**Figura 4A**) (Levine & Kroemer, 2019). La macroautofagia puede ser selectiva y no selectiva, dependiendo

del tipo de material que se va a ser englobado en los autofagosomas. Por un lado, la macroautofagia no selectiva, se induce frente a distintos estímulos de estrés y ocurre cuando los autofagosomas capturan de manera aleatoria grandes porciones del citoplasma para su degradación (Nakatogawa, 2020). Por otro lado, en la macroautofagia selectiva, los objetivos de degradación son estructuras específicas. Para ello se requieren receptores que interactúen tanto con la carga como con la maquinaria molecular central que participa en la formación del autofagosoma (Feng et al., 2014). Los tipos de macroautofagia selectiva se clasifican según el tipo de carga que se va a degradar: mitocondrias (mitofagia), gotas de lípidos (lipofagia), lisosomas (lisofagia), RE (reticulofagia), entre otros (Stolz et al., 2014).

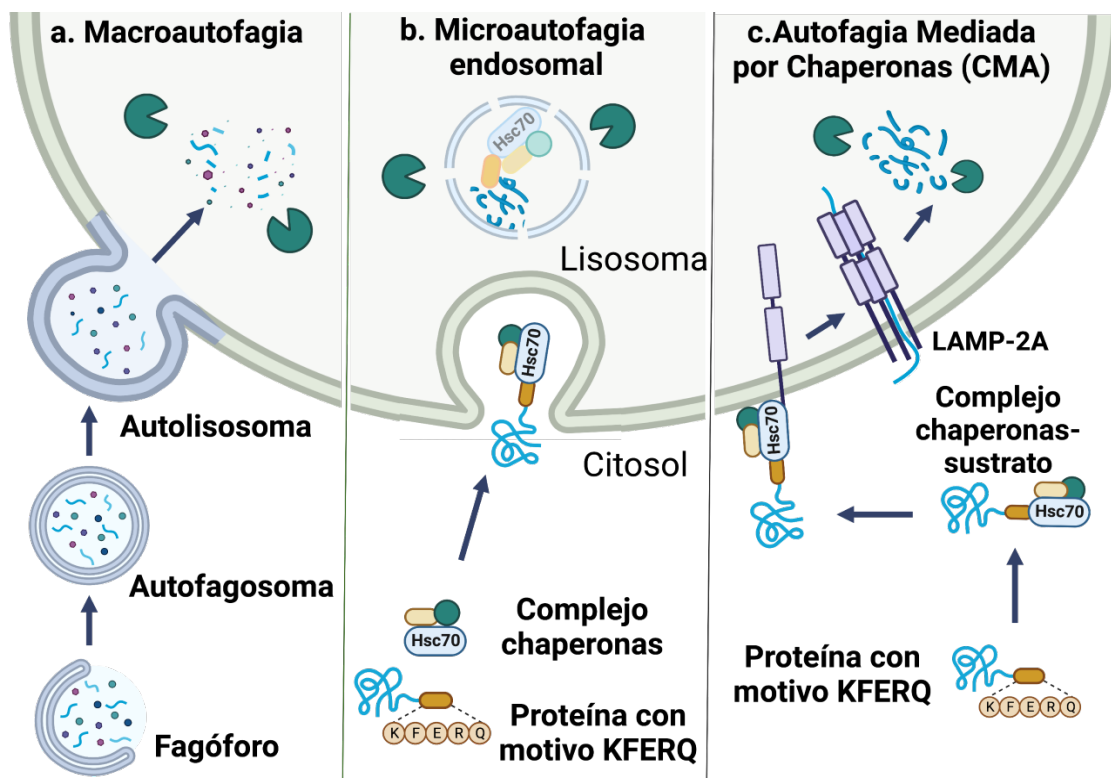


Figura 4 . Tipos de autofagia. A) Macroautofagia. B) Microautofagia endosomal. C) Autofagia Mediada por Chaperonas. Figura realizada con Biorender, adaptado a partir de Kaushik & Cuervo, 2018. Figura extraída de: Trabajo Fin de Grado, “La autofagia mediada por chaperonas y su relación en el fenómeno del envejecimiento”, realizado por María Martínez Cuenca.

En cuanto a la microautofagia, esta se basa en la eliminación de proteínas y orgánulos a través de la invaginación directa de la membrana de los lisosomas. De manera similar a la macroautofagia, la microautofagia también puede seleccionar de manera específica el material secuestrado, y recibe diferentes nombres dependiendo de si su objetivo son los peroxisomas (micropexofagia), las mitocondrias (micromitofagia) o fragmentos del núcleo celular (microautofagia segmentaria) (Lamark & Johansen, 2021). Cabe destacar el proceso de la microautofagia endosomal, un tipo de microautofagia en la que tiene lugar la degradación de proteínas citoplasmáticas, las cuales son secuestradas en vesículas originadas en la membrana de los endosomas tardíos o de los cuerpos vesiculares. La proteína chaperona de choque térmico de 70 kDa (Hsc70) desempeña un papel crucial en el reconocimiento de proteínas citosólicas tanto en la microautofagia endosomal como en la autofagia mediada por chaperonas (**Figura 4B**) (Tekirdag & Cuervo, 2018).

Finalmente, es importante mencionar la autofagia mediada por chaperonas. En este proceso, la Hsc70 identifica específicamente las proteínas citosólicas que contienen un pentapéptido en su secuencia de aminoácidos con motivos similares a KFERQ. Tanto la chaperona Hsc70 como otras cochaperonas, como Hsp40 (Proteína de choque térmico de 40 kDa) y HOP (Proteína organizadora Hsp70-Hsp90), facilitan su transporte e internalización en los lisosomas a través del receptor LAMP-2A (Proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A) (**Figura 4C**) (Kaushik & Cuervo, 2018). Es importante resaltar que existe una actividad compensatoria entre la macroautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. Esto significa que, si la actividad de una de estas vías disminuye, la otra puede aumentar su actividad para compensar esta deficiencia.

2.3.2. Maquinaria molecular de la autofagia

El proceso de macroautofagia se puede dividir en cuatro etapas: inducción (1), nucleación del fagoforo (2), elongación (3), fusión del autofagosoma con el lisosoma (4) y degradación y reutilización de la carga citoplasmática (5). La iniciación de la membrana de aislamiento o fagoforo parece originarse principalmente de la bicapa lipídica aportada por el RE y/o del trans-Golgi y los endosomas tardíos. Además, se ha sugerido que la membrana plasmática y las mitocondrias también pueden servir como posibles fuentes para la iniciación de la membrana del fagoforo (Glick et al., 2010) (**Figura 5**).

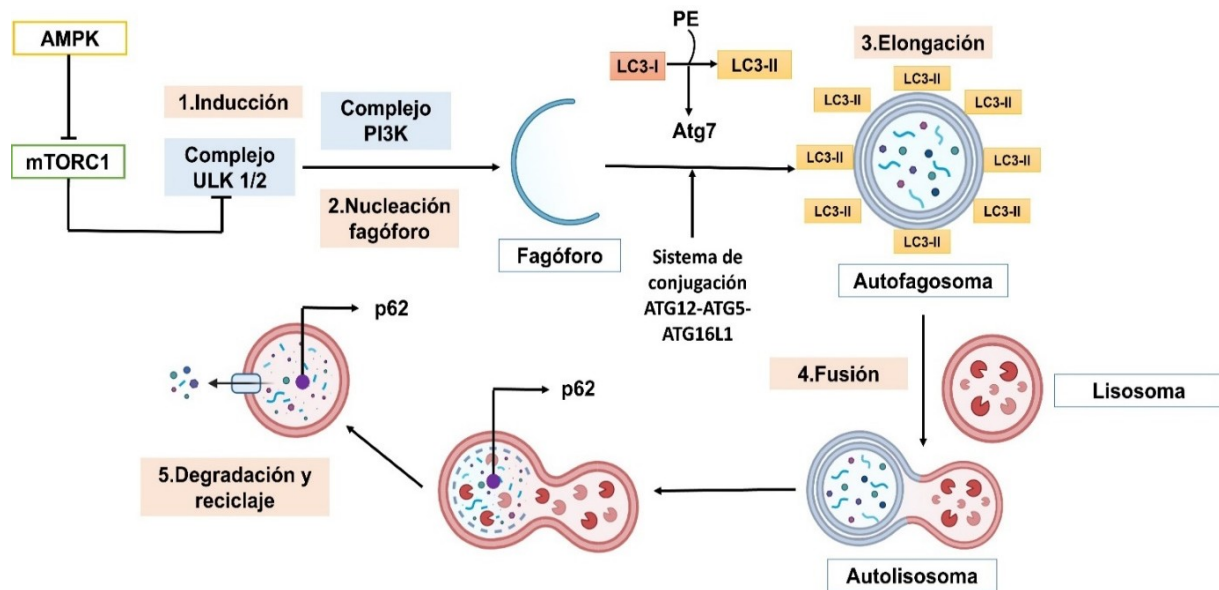


Figura 5 . Los cinco pasos principales involucrados en el proceso de autofagia: 1.Inducción: AMPK inhibe a mTORC1, que provoca la desfosforilación de ULK1 y la inducción de la macroautofagia. 2.Nucleación: Implica el complejo de PI3K. 3.Elongación: El complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 y el sistema Atg8/LC3, son clave en la formación del autofagosoma. 4.Fusión: El autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar el autolisosoma. 5.Degradación y reciclaje. La carga se degrada en el autolisosoma. Figura realizada con Biorender. Adaptación de Parmar et al., 2022.

1. Inducción

En la macroautofagia, la inducción de la formación de autofagosomas está regulada por el complejo ULK1/2, que incluye ULK1/2 (Quinasa Activadora de Autofagia Similar a Unc-51 1/2), ATG13, RB1CC1/FIP200 y C12orf44/ATG101. La macroautofagia se encuentra regulada por diversas vías de señalización intracelular, entre ellas destacan la vía mTOR (diana de rapamicina en células de mamífero) y la ruta AMPK (Proteína quinasa activada por AMP). En presencia de nutrientes y factores de crecimiento, mTORC1 (Complejo de mTOR 1), una serina/treonina-proteína quinasa, conocido como el regulador maestro de la autofagia, se encuentra activo y media la fosforilación inhibitoria de la proteína quinasa ULK1. En consecuencia, inhibe la macroautofagia. Por el contrario, en condiciones que inducen la autofagia, se activa la quinasa AMPK, el principal sensor de la relación AMP/ATP, que es un regulador positivo de la macroautofagia. Así, AMPK inhibe a mTORC1, que se disocia del complejo de inducción, lo que provoca la desfosforilación de ULK1 y la inducción de la macroautofagia (**Figura 5**) (Dossou & Basu, 2019).

2. Nucleación del fagoforo

El siguiente complejo reclutado en el sitio de formación del autofagosoma es el complejo de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) que se desencadena por la actividad quinasa de ULK1. El

complejo PI3K genera fosfatidil inositol trifosfato, que señala el inicio de la nucleación autofágica. Este complejo está compuesto por Vps34, ATG14, p150 y Beclin1. Cabe destacar que Vps34 utiliza fosfatidilinositol como sustrato para generar fosfatidil inositol trifosfato, que es esencial para el alargamiento y el reclutamiento de otras proteínas ATG en el fagoforo. Asimismo, dos proteínas que también participan en la macroautofagia denominadas WIPI1 y WIPI2, se asocian con el fagoforo durante la falta de aminoácidos mediante la unión a fosfatidil inositol trifosfato (**Figura 5**) (Glick et al., 2010).

3. Elongación

Existen dos sistemas de conjugación que involucran proteínas similares a la ubiquitina que contribuyen a la expansión del fagoforo.

- **Complejo ATG12-ATG5-ATG16L1.** El complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 se asocia con la membrana del fagoforo, pero se disocia después de la finalización del autofagosoma.
- **Sistema Atg8/LC3:** El segundo sistema similar a la ubiquitina implicado en la formación de autofagosomas es el sistema Atg8 conocido como la proteína 1 de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC3) en mamíferos. Existen varias proteínas similares a Atg8, la última de las cuales se divide en las subfamilias LC3 y GABARAP (Proteína asociada al receptor de ácido γ -aminobutírico). La proteína LC3 ha sido la mejor caracterizada y cuenta con dos isoformas, LC3-I y LC3-II. LC3-I se genera a partir de pro-LC3 mediante la cisteína proteasa Atg4. Más adelante, a través de ATG7 que actúa como una enzima E1, ATG3 que actúa como una enzima similar a E2 y el complejo ATG12-ATG5-ATG16L que posee actividad similar a una ligasa E3, LC3 se conjuga con el fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE) para formar LC3-II. Durante la formación del autofagosoma, los complejos ATG12-ATG5 se liberan de las membranas, mientras que LC3-II se asocia a la membrana, pero puede liberarse de ésta como resultado de una segunda escisión mediada por Atg4. Por tanto, LC3-I se encuentra en el citosol y solo puede localizarse en la membrana del autofagosoma cuando se lipida para formar LC3-II. Cabe destacar que, durante este proceso, LC3-II se encuentra tanto en la cara interna como en la externa de la membrana del autofagosoma. Cuando se encuentra en la cara interna, LC3-II está directamente involucrado en la captación del material citoplasmático y la formación de la doble membrana del autofagosoma. Por otra parte, LC3-II en la cara externa tiene como función principal la movilización del autofagosoma dentro de la célula. Una vez que se ha formado el autolisosoma, el contenido interno, incluyendo LC3-II en la cara interna, es degradado por enzimas lisosomales, mientras que LC3-II de la cara externa puede ser reciclado y reutilizado por la célula (Parzych & Klionsky, 2014).

En este punto, las proteínas y orgánulos destinados a la degradación son englobados por el autofagosoma. Algunas de estas proteínas que van a ser degradadas se unen de manera selectiva a proteínas adaptadoras dependientes de ubiquitina como p62 (también conocida como sequestosoma 1 o SQSTM1), NBR-1 y optineurina, las cuáles interactúan con LC3-II (Lamark et al., 2017) (**Figura 5**).

4 y 5. Fusión, degradación y reutilización de la carga citoplasmática

La membrana del fagoforo se cierra alrededor de la carga y, desde la superficie exterior, se escinde LC3-II. A continuación, el fagoforo en expansión madura y se cierra formando un autofagosoma completo, que transita y se fusiona con el lisosoma, formando el autolisosoma. Por último, los componentes citoplasmáticos engullidos se degradan en los autolisosomas por las enzimas hidrolasas lisosomales (Nikoletopoulou et al., 2015) (**Figura 5**).

2.3.3. La autofagia de células α y β pancreáticas en la DT1

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la autofagia es un mecanismo que utilizan las células eucariotas para descomponer y reciclar las proteínas y los orgánulos citoplasmáticos dañados de manera eficiente. Este proceso es fundamental para mantener la homeostasis y la función de las células β (Riahi et al., 2016). El impacto de la autofagia en la diabetes es controvertido. Por un lado, se ha identificado que la autofagia actúa como un regulador crítico en la actividad de las células β y que diversos factores de estrés celular, como el estrés oxidativo y el estrés del RE, pueden potenciar la activación de la autofagia. Por tanto, la autofagia se desencadenaría en las células β proporcionando sustratos energéticos con el fin de enfrentar el estrés del RE (Rashid et al., 2015). Por otro lado, se ha documentado una alteración en el recambio autofágico en células β de pacientes diabéticos tipo 2 (Masini et al., 2009), ya que muestran una acumulación de autofagosomas y en células β que han sido sometidas a una exposición prolongada a ácidos grasos y glucosa (Las et al., 2011).

La mayoría de los estudios que se han realizado para investigar el papel de la autofagia en la diabetes se han centrado en la DT2. Entre estas investigaciones de la relación entre la autofagia y la DT2 cabe destacar un estudio en el que se le suministró una dieta con alto contenido en grasas a ratones C57BL/6J, los cuáles son susceptibles a desarrollar DT2 cuando se les alimenta con una dieta alta en grasas y a ratones db/db diabéticos. Se informó que una dieta alta en grasas desencadenó un incremento en el número de autofagosomas en las células β de ratones db/db y en ratones C57BL/6, por lo que la autofagia se regulaba positivamente con el fin de compensar el estrés metabólico de las células β . Por otro lado, estos autores observaron que el *knockout* de *Atg7* en células β de ratones produjo una degeneración de sus islotes, una alteración de la tolerancia a

la glucosa y una disminución en la secreción de insulina. Los ratones *knockout* deficientes en autofagia exhibieron un marcado deterioro en la tolerancia a la glucosa, potencialmente atribuido a la falta de un aumento compensatorio en la masa de células β (Ebato et al., 2008). Otro estudio usando la misma aproximación, ratones *knockout* de *Atg7*, reveló que la masa de células β y el contenido de insulina pancreática de estos ratones disminuyó, ya que se produjo un aumento de la apoptosis y una disminución de la proliferación de las células β . Además, se documentaron altos niveles de estrés oxidativo, distensión del RE y cambios vacuolares en las células β (Jung et al., 2008). En la misma línea, otro estudio posterior demostró que la alteración de la autofagia mediante la disminución de *Atg7* en células β en ratones C57BL/6J provocó una disminución de la masa de células β , una tolerancia a la glucosa deteriorada, defectos en la secreción de insulina y un aumento de la apoptosis después de la administración de una dieta combinada rica en grasas y glucosa (Sheng et al., 2017). Estos estudios sugieren que la autofagia es esencial para preservar la arquitectura, masa y función de las células β pancreáticas.

Si bien estudios recientes han evidenciado una alteración de la autofagia en las células β durante la patogénesis de la DT1. En los primeros estadios de la DT1, las células β pancreáticas están expuestas a factores que pueden causar daño, como citoquinas proinflamatorias o hiperglucemia, que pueden ocasionar la acumulación de especies reactivas de oxígeno y provocar daños durante el desarrollo de esta enfermedad (Padgett et al., 2013). A su vez, se ha evidenciado que la alteración de la autofagia puede llevar a que las células β sean más sensibles a la apoptosis celular (Hayes et al., 2017). En el contexto de la DT1, se ha observado que hay una alteración de la autofagia y que en donantes de órganos humanos con autoanticuerpos positivos se altera la degradación de macromoléculas dañadas en la célula β . En islotes pancreáticos de ratones NOD, se observó un aumento en el número de autofagosomas y p62, indicando una alteración de la autofagia. En estos mismos islotes y en islotes de pacientes con DT1 disminuyó la colocalización de LC3 con LAMP1, sugiriendo un deterioro en las etapas lisosomales de la autofagia. Además, se observó la acumulación de lipofuscina en los islotes pancreáticos de donantes de órganos con autoanticuerpos positivos, lo que sugiere una desregulación temprana de la autofagia en la DT1, antes de que la enfermedad clínica se manifieste (Muralidharan et al., 2021).

Por tanto, existe una amplia evidencia que respalda el papel relevante de la autofagia en el mantenimiento de la homeostasis y la supervivencia de las células β . Sin embargo, todavía no se ha descrito completamente de qué manera la autofagia afecta tanto a la homeostasis como a la función de las células α secretoras de glucagón. Se destaca un estudio donde se investigó la autofagia en células α utilizando un modelo de ratón con deficiencia de *Atg7*, una molécula esencial en la formación de autofagosomas. Se observó un aumento en el número de células que expresaban

glucagón y una disminución en la proliferación celular, efectos similares a los observados en las células β . En consecuencia, se reveló que la autofagia en las células α es fundamental para mantener su estructura y promover la proliferación celular (Himuro et al., 2019).

Distintos estudios han evidenciado el papel protector de la autofagia tras el estrés del RE en la diabetes. Un estudio realizado por Bartolome y colaboradores en el que se llevó a cabo la inhibición de la autofagia, así como el silenciamiento de los genes *Atg5* o *Atg7* en células β de ratones fetales, provocó un aumento de la muerte celular mediada por el estrés del RE a la vez que disminuyó drásticamente los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Bartolome et al., 2012). Cabe destacar un estudio in vivo en el que células β deficientes de autofagia desencadenaban la aparición de diabetes y también se mostraban más sensibles al estrés del RE (Quan, Hur, et al., 2012). Sin embargo, distintos estudios apuntan una dualidad en el mecanismo de la autofagia, ya que unos niveles excesivos de autofagia pueden llevar a la muerte celular. No obstante, este papel dual depende del tipo celular y del entorno citosólico de estas células (Eisenberg-Lerner et al., 2009; Kim & Lee, 2010). Por otro lado, se ha investigado el papel de ciertas citoquinas en la inducción de la autofagia en células β pancreáticas. Las citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la IL-1 β y el interferón- γ (IFN- γ) se han relacionado con la DT1 (Coomans de Brachène et al., 2024). Se determinó que las citoquinas proinflamatorias, IL-1 β y el IFN- γ , secretadas por las células inmunitarias que invaden los islotes de Langerhans, estimulan los primeros pasos de la autofagia, ya que activan la vía AMPK-ULK-1 e inhiben mTORC1. Sin embargo, bloquean el flujo autofágico, lo que potencia el estrés del RE (Lambelet et al., 2018).

Sin embargo, aunque se ha determinado que los IFN-I inducen autofagia en líneas celulares cancerosas como Daudi (células B de linfoma humano), HeLa (células epiteliales de cáncer cervical humano), MDA-MB-231 (células de carcinoma mamario humano), entre otras (Schmeisser et al., 2014; Schmeisser et al., 2013), el efecto del IFN α en la inducción de la autofagia de células α y β apenas se ha estudiado con anterioridad. Se ha demostrado defectos en el flujo autofágico basal y estimulado por IFN α en células β en un modelo de ratón con diabetes autoinmune espontánea, el ratón diabético no obeso (NOD), antes del desarrollo de hiperglucemia. Además, se ha observado una respuesta heterogénea de los islotes donantes humanos a la autofagia inducida por IFN α (Melnyk et al., 2023). En la fisiopatología de la diabetes no solo interviene la insuficiente secreción de insulina por parte de las células β , sino también la secreción inadecuada de glucagón por parte de las células α (Röder et al., 2016). Por consiguiente, una comprensión más profunda de la biología de las células α y β estudiando el efecto del IFN α en ambos tipos celulares permitirá una visión integral de la homeostasis de la glucosa y del desarrollo de la diabetes.

2.4. Resultados preliminares RNA-seq

Para poder dilucidar el efecto del IFN α en la autofagia de células α y β pancreáticas, el grupo de investigación al que pertenezco realizó un análisis de secuenciación de ARN (RNA-seq) (Figura 6). Para realizarlo se utilizó un ratón transgénico, al cual se le colocó una sonda venus bajo el promotor del gen de glucagón (*Venus-GCG*), lo que hace que todas las células α expresen esta sonda fluorescente y nos permite su separación. En cuanto al procedimiento experimental, se recogieron islotes pancreáticos de ratones *Venus-GCG* los cuáles fueron tratados o no con IFN α durante 24 horas. Los islotes se disociaron en células individuales y las células α y β pancreáticas se separaron mediante la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Por último, se llevó a cabo el RNA-seq. En este análisis se estudió la expresión global de los principales genes de autofagia que eran expresados en células α y β pancreáticas de islotes de ratón tratados con IFN α durante 24 horas.

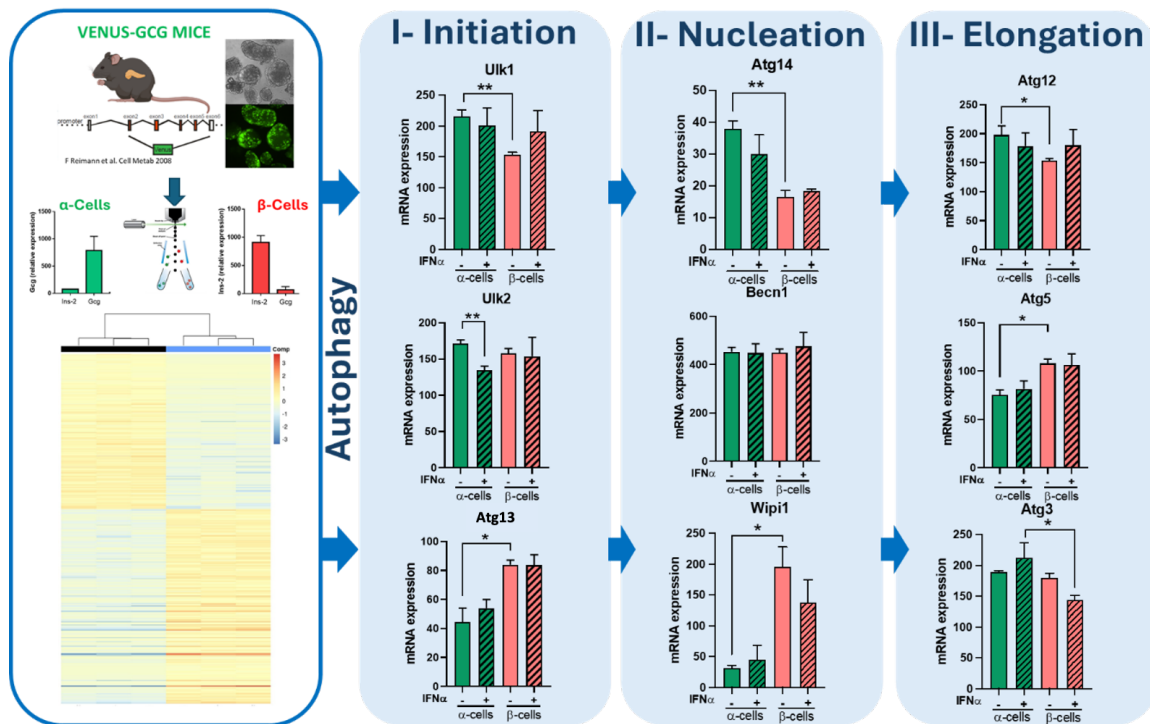


Figura 6. Análisis de expresión génica de células α y β purificadas de ratón (*Venus-GCG*) mediante RNA-Seq. Islotes pancreáticos procedentes del modelo de ratón *Venus-GCG* se trataron con IFN α durante 24 horas. Los islotes se disociaron en células individuales y se separaron mediante FACS sorting en diferentes subpoblaciones y se realizó secuenciación global de mRNA (RNA-seq). Se analizaron distintos genes clave que participan en etapas clave del proceso de autofagia: iniciación, nucleación y elongación. Las gráficas de barras muestran la media \pm SEM de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Two-ways ANOVA.

Se observaron diferencias en la expresión de diferentes genes que participan en las etapas clave del proceso de autofagia: iniciación, nucleación y elongación en células α y β pancreáticas que

fueron tratadas con IFN α . En cuanto a la etapa de iniciación, cabe destacar una menor expresión de ULK1 en células β pancreáticas con respecto a las células α en condiciones basales. Además, hay una disminución en la expresión de ULK2 en células α tratadas con IFN α con respecto a la condición control. Se han visto diferencias significativas en la expresión de ARNm del gen *Atg14*, que participa en la nucleación autofágica en células α y β no tratadas con IFN α . A su vez, los genes *Atg12*, *Atg5* y *Atg3*, que participan en la etapa de elongación, mostraron diferencias significativas en su expresión en las distintas condiciones (**Figura 6**) (Datos no publicados).

3. OBJETIVOS

La autofagia es un proceso esencial para el mantenimiento de la homeostasis y la salud de las células eucariotas. Distintos estudios apuntan el papel clave de la autofagia en la regulación de la homeostasis de las células β pancreáticas y que ésta se desencadena para aliviar el estrés oxidativo y el estrés del RE en la diabetes. La regulación de la autofagia en la DT2 ha sido estudiada por diversos autores que apuntan su relevancia para preservar la estructura, masa y función de las células β pancreáticas y que su declive conduce a una deficiencia de insulina e hiperglucemia debido al mal funcionamiento y renovación anormal de los orgánulos. No obstante, los conocimientos acerca de su implicación en la DT1 son escasos. Se ha apuntado que citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1 β y el IFN- γ están relacionadas con ciertos mecanismos involucrados en la inducción de estrés en el RE que afectan a la autofagia, sin embargo, se desconoce si el IFN α ejerce alguna acción sobre la autofagia en células α y β pancreáticas. Basándonos en nuestros resultados preliminares de secuenciación de ARN (RNA-seq), las células α y β pancreáticas de islotes de ratón muestran expresión diferencial de genes implicados en las etapas de autofagia tras la exposición a IFN α .

Por todo ello, y teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, en el presente Trabajo de Fin de Máster se ha propuesto como **objetivo principal** investigar el papel de la autofagia tras la exposición a IFN α , citoquina característica de las primeras etapas de la DT1, tanto en células β (MIN-6) como en células α pancreáticas (α TC1-9).

A su vez, se han propuesto alcanzar los siguientes **objetivos secundarios**:

1. Estudiar el flujo autofágico en células α y β pancreáticas expuestas a IFN α , mediante el uso de distintos compuestos moduladores de la autofagia.
2. Estudiar la expresión y localización de la proteína LC3 en células α y β pancreáticas tras la exposición a IFN α en presencia y ausencia de moduladores del flujo autofágico.
3. Estudiar como la modulación del flujo autofágico en presencia de IFN α afecta a la viabilidad celular de las células α y β pancreáticas.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Todos los procedimientos realizados en este trabajo han sido aprobados por el comité ético de la UMH con el código **TFM.MBB.LME.MMC.231215**.

4.1. Manejo y uso de líneas celulares

En este trabajo se emplearon dos líneas de células pancreáticas: la línea de célula β , MIN-6, la cual fue obtenida de insulinoma de ratón (Miyazaki et al., 1990) y la línea de célula α , α TC1-9, obtenida del páncreas de un ratón con adenoma (Hamaguchi & Leiter, 1990). Para el crecimiento y mantenimiento de estas líneas celulares se utilizaron medios recomendados por la casa comercial, cuya composición es descrita en las **Tablas 1 y 2**.

Tabla 1. Composición medio de cultivo DMEM línea celular α TC1-9.

Compuesto	Concentración final en el medio
DMEM (D-2902)	--
Bicarbonato sódico	1,5 g/l
Glucosa	3 g/l
Penicilina/Streptomicina	10 μ g/ml/100 UI/ml
FBS (Fetal Bovine Serum)	10%
Aminoácidos no esenciales	0,1 mM
HEPES	15 mM

Tabla 2. Composición medio de cultivo de la línea celular MIN-6.

Compuesto	Concentración
DMEM (41965-039)	--
2-Mercaptoetanol	0,05 mM
Penicilina/Streptomicina	10 μ g/ml/100 UI/ml
FBS (Fetal Bovine Serum)	15%

En los experimentos, las células MIN-6 y α TC1-9 fueron sembradas en placas de 24 pocillos (TC-Platte 24 well, Sarstedt) para Western blot, en placas de cultivo celular (Cell culture dish, TC-Schale, Sarstedt) para inmunocitofluorescencia y en placas de 96 pocillos (TC-Platte 96 well, Sarstedt) para los ensayos de viabilidad celular. Se trabajó con células hasta el pase 80.

Los cultivos celulares se mantuvieron en unas condiciones estables de 37 °C, 95% de humedad relativa y 5% CO₂. Para la realización de estos experimentos se sembraron diferentes densidades de células según el tipo celular y el tipo de experimento (**Tabla 3**).

	MIN-6 (células/pocillo)	α TC1-9 (células/pocillo)
Western blot	$2 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$
Inmunocitofluorescencia	$5 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^4$
Viabilidad	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$

Tabla 3. Número de células sembradas por pocillo para los experimentos de Western blot, inmunocitofluorescencia y viabilidad en las líneas celulares MIN-6 y α TC1-9.

4.2. Preparación de los compuestos y tratamientos

Los compuestos utilizados en este Trabajo de Final de Máster fueron preparados a partir de soluciones stock concentradas. Estas soluciones se diluyeron posteriormente para obtener las concentraciones de trabajo necesarias para los experimentos.

La **bafilomicina A1** (B1793, Sigma) fue preparada a una concentración de 100 μ M en DMSO. A partir de la misma, se preparó una disolución intermedia de 50 μ M en DMSO, la cual se almacenó a -20°C . Para la aplicación experimental, se realizó una dilución en medio de cultivo celular para obtener la concentración final deseada de 100 nM, cuidando que la concentración final de DMSO en el medio no excediera el 0,1%.

La **cloroquina** (C6628, Sigma) fue preparado como una solución stock a una concentración 10 mM en H_2O , la cual se almacenó a -20°C . Las diluciones necesarias para los tratamientos experimentales se prepararon justo antes de su uso, diluyendo la solución stock en medio de cultivo celular para obtener una concentración final de 10 μ M.

Por último, la **rapamicina** (R0395, Sigma) fue preparada a una concentración de 1 mM en DMSO. A partir de la misma, se preparó una disolución intermedia de 100 μ M, la cual se almacenó a -20°C . Para la aplicación experimental, se realizó una dilución de la disolución intermedia en medio de cultivo celular para obtener la concentración final deseada de 50 nM, cuidando que la concentración final de DMSO en el medio no excediera el 0.1%.

El **IFN α** (12100-1, PBL) fue preparado según indicaciones del fabricante y se diluyó en medio completo a una concentración final de 1000 U/ml.

4.3. Western blot

La expresión de proteínas se analizó mediante western blot, esta técnica permite la identificación de una proteína específica dentro de una mezcla compleja como el lisado celular. Las expresiones de LC3-I (16-18 kDa), LC3-II (14-16 kDa) (Cell Signaling, 4108) y SQSTM1/p62 (62 kDa) (Cell Signaling, 5114), utilizando la técnica analítica western blot se compararon con la de la tubulina (55 kDa), una proteína que se expresa de manera constitutiva en el modelo de estudio.

Los lisados celulares se obtuvieron utilizando el tampón de lisis Laemmli (**Tabla 4**) y se almacenaron a -20 °C. Para llevar a cabo la electroforesis, se descongelaron 60 µL de lisado celular de cada una de las muestras en hielo y las proteínas se desnaturalizaron calentándolas a 99 °C durante 7 minutos.

Tabla 4. Composición Tampón Laemmli.

Compuesto	Concentración
Glicerol	2%
DTT	20 mM
Tris pH 8.0	12,5 mM
SDS	0,4%
Bromofenol azul	0,04 mg/mL
2-Mercaptoetanol	2%
Agua ultrapura	--

Seguidamente, se llevó a cabo la electroforesis en gel PRE-CAST con gradiente de concentración de poliacrilamida 4-20% (Criterion TGX, Precast Gels, Bio-Rad) en condiciones reductoras y desnaturalizantes. La electroforesis se realizó utilizando un gel sumergido en tampón de electroforesis (**Tabla 5**) aplicando una corriente constante de 90 V hasta que el frente llegó al gel separador (aproximadamente 20 minutos), en este momento se aumentó la corriente a 110 V y se mantuvo durante cerca de 120 minutos. Al finalizar la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) mediante un sistema de transferencia semiseca a 25 V durante 30 minutos (TransBlot Turbo, Bio-Rad). Durante la transferencia, tanto la membrana como el gel se mantuvieron embebidos en tampón de transferencia comercial (Bio-Rad) (**Tabla 6**).

Tabla 5. Composición Tampón de electroforesis.

Compuesto	Concentración
Tris pH 8,6	2,5 mM
Glicina	19 mM
SDS	0,01%
Agua ultrapura	--

Tabla 6. Composición Tampón de transferencia Transblot.

Compuesto	Volumen (ml)
Buffer transfer 5x	200 ml
Agua ultrapura	600 ml
Etanol absoluto	200 ml

La membrana se bloqueó utilizando una solución al 5% de leche en polvo desnatada (Hacendado, Mercadona) en TBS-T (**Tabla 7**), durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó en solución TBS-T y se incubó durante toda la noche en una solución 5% de BSA en TBS-T con los anticuerpos primarios que se describen a continuación: anti-LC3 A/B (Cell Signaling, 4108) a una dilución 1:1000, anti-p62 (Cell Signaling, 5114) a una dilución de 1:1000 y anti- α -tubulina (Sigma, T5168) a una dilución de 1:5000.

Tabla 7. Composición Tampón TBS-T.

Compuesto	Concentración
NaCl	150 mM
Tris	10 mM
Tween 20	0,05%
Agua ultrapura	--

Después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana se lavó con TBS-T tres veces durante 10 minutos cada vez. A continuación, se incubó con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano en dilución 1:5000 en TBS-T más 5% de leche durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente (cabra anti-conejo (Bio-Rad, 1706515) y cabra anti-ratón para tubulina (Bio-Rad, 1706516)). La membrana se reveló mediante la adición de sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific). La señal resultante se detectó utilizando un transiluminador (Chemi Doc MP, Bio-Rad). Las imágenes tomadas por el transiluminador se procesaron para su visualización con el software ImageLab (Bio-Rad) y la cuantificación se realizó con el software UN-SCAN-IT gel 6.1.

4.4. Inmunocitofluorescencia

Ambas líneas celulares MIN-6 y α TC1-9 fueron tratadas con bafilomicina A1. Transcurridas 6 horas del tratamiento con bafilomicina, las células se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas las células se lavaron 3 veces con tampón salino fosfato (TFS) (10 minutos por lavado) y se conservaron a 4 °C. Al día siguiente, se permeabilizaron con una solución 0,3% Triton X-100 en TFS durante 5 minutos. A continuación, se retiró el detergente y se llevaron a cabo 3 lavados con TFS (10 minutos por lavado). Las células se bloquearon con tampón de bloqueo (**Tabla 8**) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Tabla 8. Composición Tampón de bloqueo para ICF.

Compuesto	Concentración
BSA	5%
Suero de cabra	10%
TFS	--

Se emplearon los anticuerpos primarios anti-LC3A/B (Cell Signaling, 4108) y anti-p62 (Cell Signaling, 5114) en dilución 1:250 en tampón de bloqueo durante toda la noche en agitación leve. Al día siguiente, se lavó el anticuerpo primario con TFS y se incubaron las placas con anticuerpo primario anti-insulina (K36aC10, Abcam) a concentración 1:500 en el caso de las células MIN-6 y anti-glucagón (66912, Santa Cruz Biotechnology) a concentración 1:1000 en el caso de las células α TC1-9 durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez retirado el anticuerpo primario, las placas se incubaron con los anticuerpos secundarios: policlonal de cabra anti-ratón Alexa Fluor 546 (Invitrogen) y policlonal de cabra anti-rabbit 488 (Invitrogen) a concentración 1:500 en tampón de bloqueo. Se mantuvo durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó el anticuerpo secundario y se tiñeron los núcleos mediante incubación con 10 μ g/mL de sonda Hoechst 33342 (Abcam) durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las placas con TFS y se observó la fluorescencia celular en un microscopio confocal LSM900 con Airyscan 2 (Zeiss-Vision, Munich, Germany).

4.5. Evaluación de la viabilidad celular

Ambas líneas celulares (MIN-6 y α TC1-9) fueron pretratadas con IFN α durante 24 horas (1000 U/ml) y posteriormente se trataron con bafilomicina A1 (100 nM), cloroquina (10 μ M) y rapamicina (50 nM) durante 16 h.

Tras el tratamiento, las células se incubaron con dos agentes intercalantes del ADN: las sondas Hoechst 33342 (Abcam) y yoduro de propidio (PI, Abcam) se prepararon a la concentración stock de 1 mg/mL en TFS. Para las tinciones de las células MIN-6 y α TC1-9 se utilizó una concentración final de 10 μ g/mL para ambos reactivos. Después de la incubación durante 15 minutos a 37 °C en medio de cultivo de cada línea celular, se retiró la mitad del volumen de cada pocillo y se sustituyó por medio fresco de cada línea celular. Posteriormente, se cuantificó la viabilidad celular utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axiovert 200) acoplado a un diodo láser (Zeiss Colibri 7).

Se evaluó el porcentaje de viabilidad celular mediante el conteo de células viables frente a apoptóticas, en base a su diferente permeabilidad a las sondas Hoechst 33342 y PI. Las células viables y apoptóticas tempranas conservan su membrana plasmática intacta permitiendo que sólo la sonda Hoechst 33342 entre al núcleo y lo tinte de color azul. En las etapas iniciales de la apoptosis,

la cromatina se condensa y compacta, por lo que las células apoptóticas tempranas presentan un núcleo con un color azul más intenso y son fácilmente reconocibles mediante esta técnica. Por otro lado, las células apoptóticas tardías presentan una membrana comprometida, lo que permite la entrada de la sonda PI al citoplasma, tiñendo los núcleos de color rojo (**Figura 7**).

Debido a las particularidades de esta técnica, se requiere realizar un conteo doble de los pocillos por parte de dos investigadores distintos, uno de los cuales sea imparcial, es decir, que no posea conocimiento previo sobre el contenido o tratamiento de los pocillos, asegurando un recuento mínimo de 600 células por pocillo.

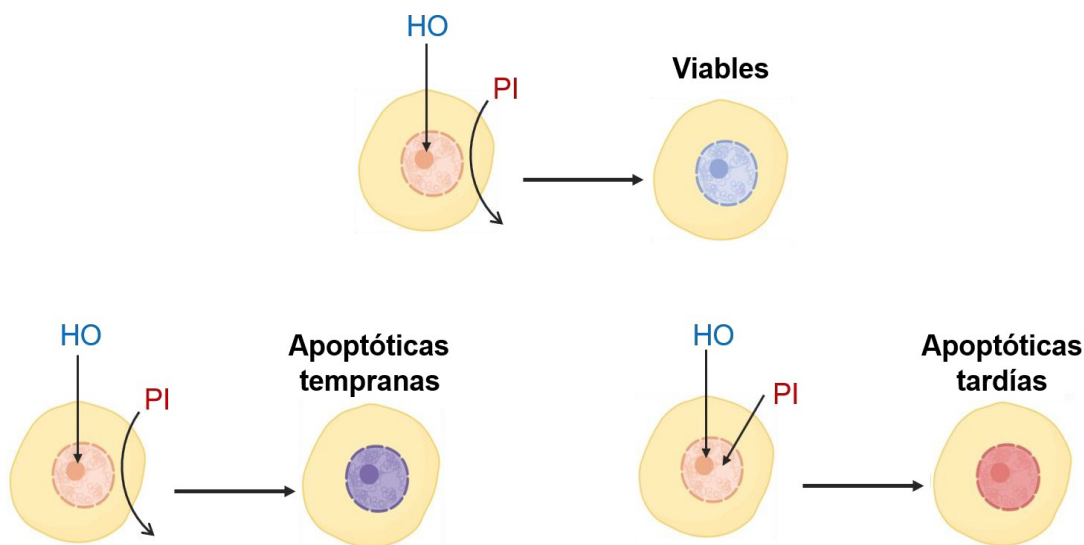


Figura 7. Esquema que ilustra el funcionamiento de la tinción por Hoechst 33342 y yoduro de propidio (PI). En las células viables el Hoechst 33342 tiñe el núcleo de color azul, mientras que expulsan el PI. Las células apoptóticas tempranas se distinguen por tener un núcleo condensado que muestra un tono de azul más intenso. Las células apoptóticas tardías pierden la impermeabilidad al PI y éste tiñe los núcleos de color rojo.

4.6. Análisis estadístico

Los resultados que se presentan en este trabajo se muestran como media \pm SEM, indicando con puntos los valores individuales de cada experimento. Los resultados de los experimentos fueron analizados y graficados mediante el software GraphPad Prism 8.0. Las comparaciones entre grupos se realizaron con test paramétricos cuando los datos se ajustaban a una distribución normal y mediante test no paramétricos cuando no se ajustaban a la misma. Los testes utilizados fueron t-test y two-way ANOVA para la comparación de grupos, tal y como se indica en los pies de figura. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Estudio del flujo autofágico

Como la autofagia es un proceso muy dinámico, es por ello que se deben realizar estudios de cambios en flujo autofágico para evaluar la autofagia. Para medir la autofagia se debe tener precaución al utilizar el término "estado estacionario", ya que describe el rango de referencia del flujo autofágico en un sistema que no está sometido a perturbaciones específicas que puedan aumentar o disminuir dicho flujo, lo que implicaría que el nivel de autofagosomas no cambia a lo largo del tiempo y que el flujo a través del sistema es constante. El flujo autofágico comprende todo el proceso de autofagia, desde el secuestro de la carga en el autofagosoma, hasta la entrega de la carga a los lisosomas y su posterior descomposición y liberación de macromoléculas de regreso al citosol. Es esencial monitorear de manera dinámica los sustratos autofágicos con el tiempo para confirmar su llegada a los lisosomas y comprobar si se ha llevado a cabo su degradación o no. Un método para estimar el flujo autofágico consiste en medir la expresión de LC3-I y LC3-II y SQSTM1/p62 como marcadores de autofagia (Klionsky et al., 2016) (**Figura 8**).

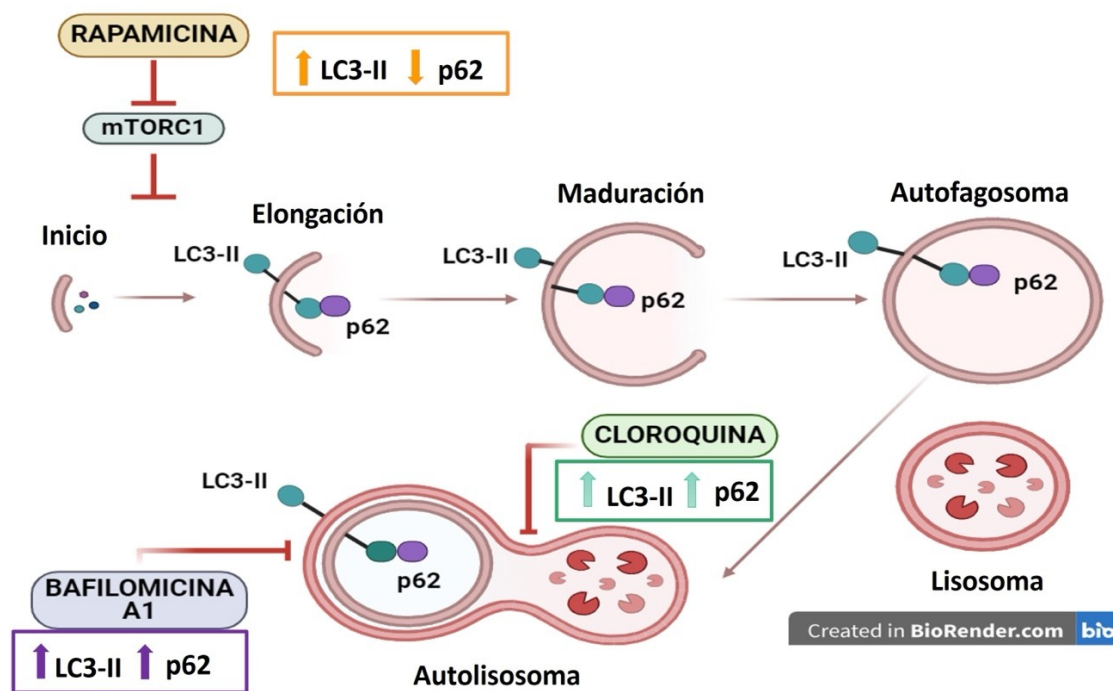


Figura 8. Representación esquemática del proceso de autofagia y los efectos de los compuestos farmacológicos: bafilomicina A1, cloroquina y rapamicina sobre el flujo autofágico. La rapamicina inhibe mTORC1, un regulador negativo de la autofagia. Esto conduce a un aumento en los niveles de LC3-II y una disminución en los niveles de p62, indicando una mayor actividad autofágica. La cloroquina inhibe la fusión del autofagosoma con el lisosoma, bloqueando la degradación del contenido autofágico. Como resultado, se observa un aumento en los niveles de LC3-II y p62. La bafilomicina A1 es un inhibidor de la V-ATPasa, que impide la acidificación del lisosoma y la degradación lisosómica del contenido autofágico. Esto resulta en un incremento de los niveles de LC3-II y p62. Figura realizada con Biorender. Adaptada a partir de Chicote et al., 2020.

Por un lado, la medición de LC3-II se ha considerado como el marcador de autofagosomas por excelencia. Como se ha descrito en el apartado 2.3.2, LC3 se sintetiza como un precursor que es procesado para generar LC3-I, la forma citosólica. Durante la formación de autofagosomas, la adición de fosfatidiletanolamina a LC3-I genera LC3-II, que se asocia a la membrana de los autofagosomas. Por este motivo, se utiliza como un indicador directo de la formación de autofagosomas. Se debe tener en cuenta que el LC3-II se puede acumular en dos situaciones:

- **Aumento en la formación de autofagosomas:** En condiciones donde hay una inducción de la autofagia, como en respuesta a la privación de nutrientes o estrés celular, se puede observar un incremento en la conversión de LC3-I a LC3-II. Esto resulta en una acumulación de LC3-II en las membranas de los autofagosomas, reflejando una mayor formación de estos orgánulos.
- **Bloqueo en la degradación de autofagosomas:** La acumulación de LC3 también puede ocurrir cuando hay una inhibición en la fusión de los autofagosomas con los lisosomas o la degradación del contenido autofágico dentro de los autolisosomas. Esto puede suceder debido a disfunciones lisosomales o inhibición de la fusión autofagosoma-lisosoma. En este caso, aunque se formen autofagosomas, no se degradan adecuadamente, lo que lleva a una acumulación de LC3-II en las células.

Estas dos situaciones resaltan la importancia de considerar tanto la formación de autofagosomas como la eficiencia del flujo autofágico completo al interpretar los niveles de LC3 en estudios de autofagia (Klionsky et al., 2016; Lambelet et al., 2018).

Por otro lado, un método para evaluar el flujo autofágico es medir la tasa general de degradación de p62. La cantidad de p62 disminuye cuando la autofagia es activa, ya que es consumido y degradado en los lisosomas. Por lo tanto, un aumento en p62 puede indicar una deficiencia en el flujo autofágico, mientras que una disminución sugiere un flujo autofágico activo (Ichimura et al., 2008).

Para estudiar con precisión la amplitud del flujo autofágico, el recambio de estas proteínas debe bloquearse artificialmente. El parámetro relevante en los ensayos de LC3 es la diferencia en la cantidad de LC3-II en presencia y ausencia de inhibidores lisosomales, que suele medirse mediante Western blot. Los inhibidores lisosomales que se han utilizado en este Trabajo de Fin de Máster son bafilomicina A1 y cloroquina, los cuales inhiben la acidificación de los autolisosomas. Ambos compuestos bloquean la fusión autofagosoma-lisosoma y como consecuencia, inhiben la actividad de las hidrolasas del lisosoma (Chicote et al., 2020; Kim et al., 2011; Mauthe et al., 2018; Pasquier, 2016) (**Figura 8**).

La **bafilomicina A1** es un inhibidor potente y específico de las H⁺-ATPasas de tipo vacuolar (V-ATPasas). Las V-ATPasas lisosomales están involucradas en la acidificación lisosomal ya que se encargan de establecer el pH del lumen, lo que permite la correcta actividad de las enzimas hidrolíticas lisosomales y en última instancia la degradación de la carga. Por tanto, al bloquear la actividad de la V-ATPasa se bloquea la fusión autofagosoma-lisosoma. La **cloroquina** es un miembro de la familia de las quinolonas que actúa como un agente intercalante débil. Cuando se someten a un pH neutro, la cloroquina es una base débil que, al no estar cargada, difunde por la membrana plasmática libremente. Por el contrario, al someterse a un pH ácido en los lisosomas, se protona y se queda atrapada, lo que aumenta el pH lisosomal. En ambos casos, las células no pueden someterse a la digestión lisosomal y esto provoca que los orgánulos y las vesículas orgánicas se acumulen. De este modo, la bafilomicina A1 y la cloroquina provocan la acumulación de LC3 y p62, impidiendo así la degradación del contenido autofágico (Pasquier, 2016).

Con relación a la **rapamicina**, se ha establecido como un activador de la autofagia que actúa inhibiendo específicamente la señalización por la vía mTORC1, la cual desempeña un papel central en la inhibición de la autofagia. La inhibición de mTORC1 por la rapamicina inhibe la represión sobre el complejo ULK1, que es esencial para la iniciación de la autofagia. Por tanto, la activación de la autofagia por la rapamicina conduce a un aumento en la formación de autofagosomas, lo cual puede observarse a través del aumento de los niveles de LC3-II. Además, la rapamicina puede conducir a una reducción de los niveles de p62, ya que la activación de la autofagia promueve la degradación de este receptor de carga en los lisosomas (Chicote et al., 2020) (**Figura 8**).

Para evaluar la eficacia de dichos compuestos, se trataron células α TC1-9 y MIN-6 con bafilomicina A1 (100 nM), cloroquina (10 μ M) y rapamicina (50 nM) durante 24 horas, como control se añadió el Vehículo en el que estaban disueltas (DMSO). De este modo, se analizaron las proteínas LC3-I (16–18 kDa), LC3-II (14–16 kDa) y p62 (62 kDa) por Western blot (**Figura 9**). Tal y como se había descrito previamente para otros modelos, en células α y β pancreáticas se obtuvo un aumento de las proteínas LC3-II y p62 en el tratamiento con los inhibidores bafilomicina A1 y cloroquina en ambas líneas celulares, indicando un bloqueo en el flujo autofágico. Cabe destacar que se observó un aumento mayor con el tratamiento con bafilomicina cuando lo comparamos con el tratamiento con cloroquina (ambos bloqueadores del flujo autofágico), especialmente en las células α TC1-9. Curiosamente, el tratamiento con cloroquina no aumentó la expresión de LC3-II en células MIN-6 (**Figura 9B**). Con respecto al tratamiento con rapamicina, éste no tuvo un claro efecto sobre la expresión de LC3, pero sí disminuyó notablemente los niveles de p62, indicando una degradación mayor de esta proteína debido al estímulo de la autofagia (**Figura 9**).

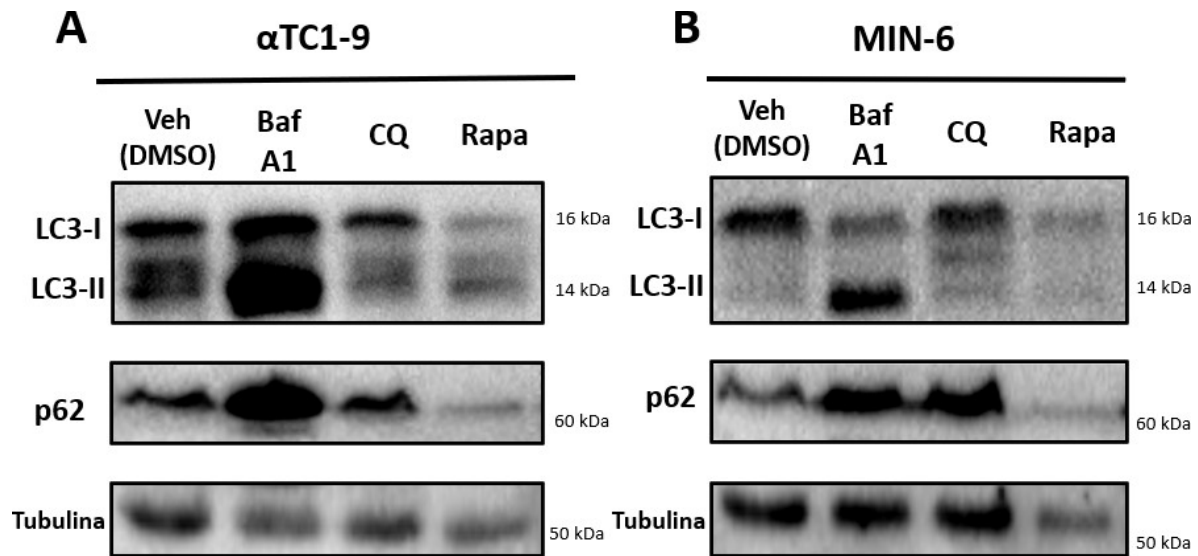


Figura 9. Expresión de marcadores del flujo autofágico en células α TC1-9 y MIN-6. Las células α TC1-9 (A) y MIN-6 (B) fueron tratadas con bafilomicina A1 (Baf A1; 100 nM), cloroquina (CQ; 10 μ M) y rapamicina (Rapa; 50 nM) durante 24 horas, al control se le añadió el vehículo en el que estaban disueltos los compuestos (DMSO). Se evaluaron las proteínas LC3-I (16-18 kDa), LC3-II (14-16 kDa), p62 (62 kDa) y tubulina (55kDa). Se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Como control de carga se usó la α -Tubulina (55kDa).

5.2. El tratamiento con IFN α no indujo diferencias adicionales al co-tratarse con moduladores de la autofagia en MIN-6 y α TC1-9

Para el estudio del efecto del IFN α sobre el flujo autofágico, las líneas MIN-6 y α TC1-9 se trataron con bafilomicina A1, cloroquina y rapamicina en la ausencia o presencia de IFN α (1000 U/ml). Estos tratamientos fueron realizados simultáneamente y recogidos tras 0, 2, 4 y 8 h de exposición (**Figura 10**).

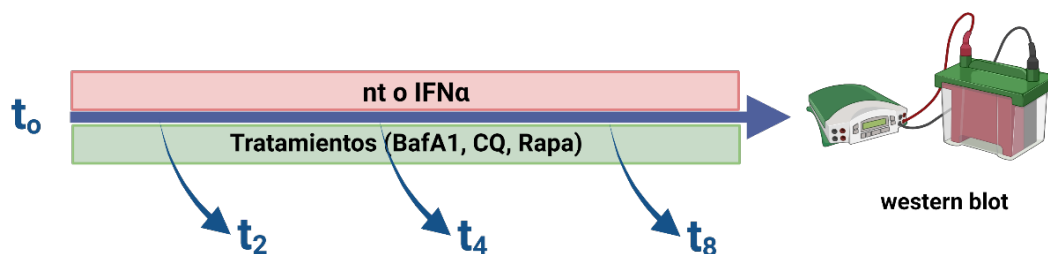


Figura 10. Diseño experimental para el estudio del flujo autofágico tras el co-tratamiento de IFN α y moduladores del flujo autofágico. En el esquema se muestra el tiempo de co-tratamiento (t_0), así como los tiempos a los cuales serán recogidos los extractos celulares 0, 2, 4 y 8 horas (t_0 - t_8). Las diferentes proteínas se midieron mediante **western blot**.

En ausencia de moduladores de autofagia (vehículo, DMSO), en las células α TC1-9 (**Figura 11A**) se observó un mayor aumento de las bandas LC3-II y p62 a partir de 4 horas tanto en las condiciones sin y con tratamiento con IFN α que en las células β (MIN-6). En las células MIN-6 (**Figura 11 B**), se observó que la banda LC3-II a las 0 y 2 horas en la condición sin tratamiento era mayor que las células tratadas con IFN α , sin embargo, en ambos casos su expresión fue disminuyendo con el tiempo. En la condición del tratamiento con IFN α , la expresión de p62 se mantuvo constante en cada una de las condiciones.

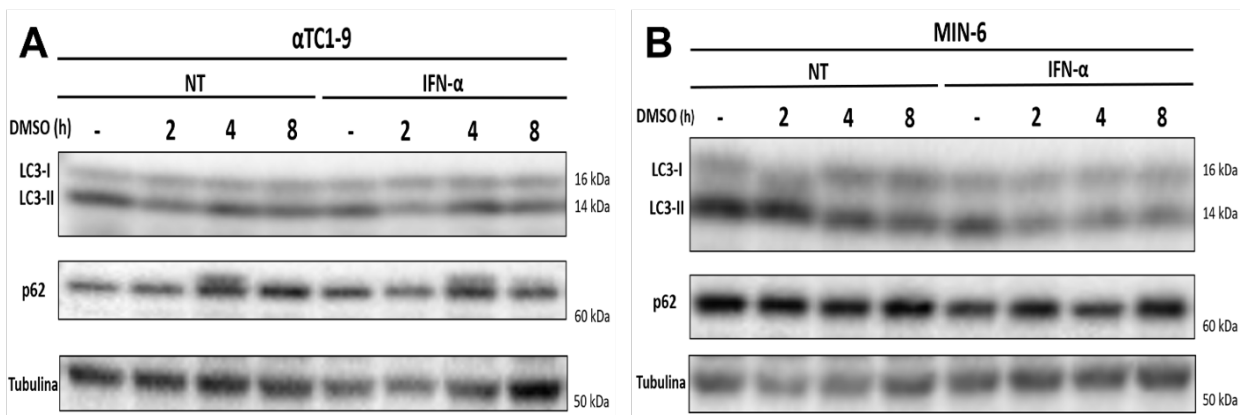


Figura 11. Cambios en LC3 I/II y p62 inducidos por IFN α . Western blot representativo de células α TC1-9 (A) y MIN-6 (B) tratadas con IFN α (1000 U/ml) tras 0h, 2h, 4h, 8h. La expresión de las proteínas LC3-I (16-18 kDa), LC3-II (14-16 kDa), y p62 (62 kDa) se midió mediante *western blot*; se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Como control de carga se usó la α -Tubulina (55kDa).

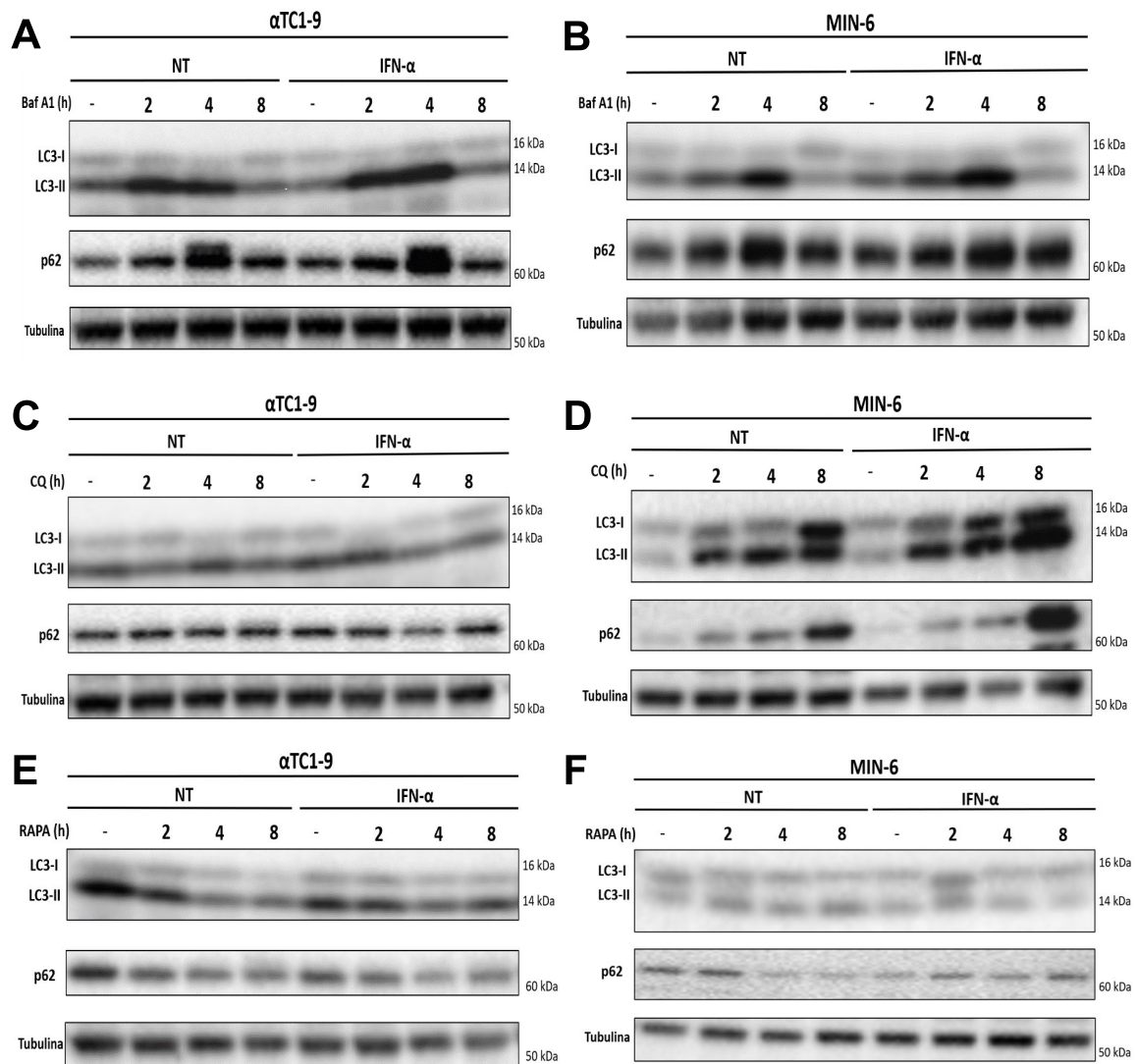


Figura 12. La aplicación conjunta de cada uno de los fármacos bafilomicina A1, cloroquina y rapamicina con IFN α no provocó una alteración del flujo autofágico en α TC1-9 y en MIN-6. Western blot representativo de células α TC1-9 (A, C, E) y células MIN-6 (B,D,F) tratadas con Baf A1 (100 nM) (A,B), CQ (10 μ M) (C,D) y Rapa (50 nM) (E,F) en combinación o no (NT) con IFN α (1000 U/ml) tras 0, 2, 4 y 8h. Se midió la expresión de proteínas: LC3-I (16-18 kDa), LC3-II (14-16 kDa), y p62 (62 kDa) mediante *western blot*; se muestran imágenes representativas de 3 experimentos independientes. Como control de carga se usó el α -Tubulina (55kDa).

Tanto las células α TC1-9 (Figura 12A) como en las células MIN-6 (Figura 12B) tratadas con bafilomicina A1, aumentaron las proteínas de LC3-II y p62 hasta los mismos niveles, con o sin IFN α . Por otro lado, el tratamiento con cloroquina, también inhibidor del flujo autofágico, produjo efectos diferentes dependiendo del tipo celular. En células α TC1-9 (Figura 12C) la cloroquina produjo un ligero aumento de la proteína LC3-II acompañada de una disminución de la proteína LC3-I tras 4 horas de tratamiento, sin cambios en la proteína p62, con y sin tratamiento con IFN α . Sin embargo, en células MIN-6 (Figura 12D) la cloroquina tuvo un efecto incluso mayor que la bafilomicina bloqueando el flujo autofágico, obteniendo niveles mayores de LC3-II y p62 aunque sin diferencias

debidas al IFN α . No obstante, el tratamiento con rapamicina (**Figura 12E y 12F**), tratamiento que acelera el flujo autofágico, produjo un aumento de la degradación de p62 en ambos tipos celulares. Este aumento de la degradación fue más evidente en la línea celular α TC1-9 que en la línea de células β MIN-6. No se observó aumento de la proteína LC3-II en ninguno de los tipos celulares, en todo caso se observa una disminución no significativa de la proteína, sin diferencias relacionadas al tratamiento con IFN α .

Como conclusión de esta parte podemos decir que, cuando el tratamiento con IFN α fue añadido al medio al mismo tiempo que los moduladores de la autofagia, no hubo diferencias significativas relacionadas con el tratamiento con IFN α .

5.3. El IFN α provoca un bloqueo en el flujo autofágico en α TC1-9 pero no en MIN-6

En este punto del trabajo se decidió realizar un pre-tratamiento (24 h) con IFN α para dejar que la citoquina haga sus efectos, principalmente efectos transcripcionales, en ambas líneas celulares y posteriormente se trataron con los compuestos moduladores de la autofagia bafilomicina A1, cloroquina y rapamicina (**Figura 13**).

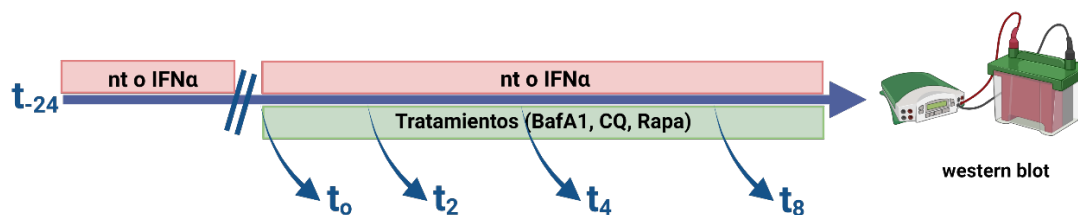


Figura 13. Diseño experimental para el estudio del flujo autofágico tras el pre-tratamiento con IFN α durante 24 h y el posterior co-tratamiento en presencia o ausencia de IFN α y moduladores del flujo autofágico. En el esquema se muestra el tiempo de pre-tratamiento (t_{-24}) y co-tratamiento (t_0), así como los tiempos a los cuales serán recogidos los extractos celulares 0, 2, 4 y 8 horas (t_0 - t_8). Las diferentes proteínas se midieron mediante **western blot**.

Las líneas MIN-6 y α TC1-9 fueron pre-tratadas con IFN α (1000 U/ml) durante 24 horas. Tras el pre-tratamiento las células se trataron con bafilomicina A1, cloroquina y rapamicina en la ausencia o presencia de IFN α (1000 U/ml). Estos tratamientos fueron realizados simultáneamente y recogidos tras 0, 2, 4 y 8 h de exposición (**Figura 13**).

En células α -TC19, observamos que el tratamiento con IFN α disminuyó la expresión tanto de LC3-II como de p62 a partir de las 4 h de tratamiento (**Figura 14A**). Esta disminución inducida por IFN α es más clara tras la normalización de la expresión de LC3-II con respecto a tubulina (**Figura 14B**). De manera similar, también se observa una menor expresión de p62 en células tratadas con IFN α con respecto al control, aunque no se aprecia una disminución significativa (**Figura 14C**). En el caso de la línea celular MIN-6 no se observan apenas diferencias en la expresión de LC3-II y de p62 en el tratamiento con IFN α con respecto a la condición control (**Figura 14D-F**). Por tanto, estos hallazgos sugieren que el IFN α induce un bloqueo en la autofagia en células α , pero este efecto no es tan evidente en células β pancreáticas.

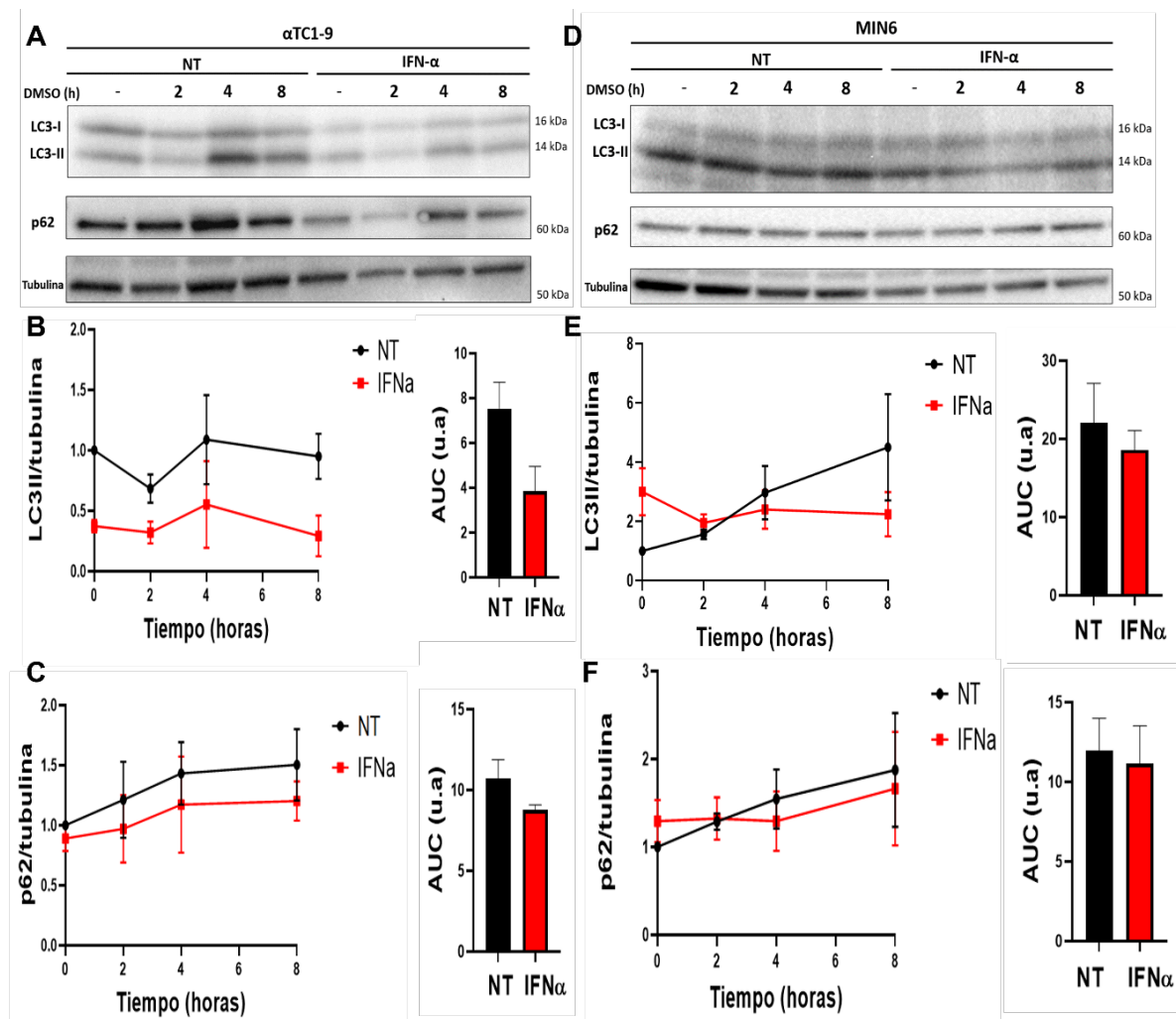


Figura 14. Efecto del IFN α sobre las proteínas LC3-I/II y p62 en α TC1-9 y MIN-6. Células α TC1-9 (A,B,C) y MIN-6 (D,E,F) fueron pre-tratadas con IFN α (1000 U/ml, rojo) o no (NT, negro) durante 24 h y posteriormente fueron tratadas conjuntamente con IFN α (1000 U/ml) o vehículo (DMSO) durante 8 h adicionales. Las muestras se recolectaron en los tiempos indicados en la figura (0, 2, 4 y 8 horas). Imagen de Western blot representativa de células α TC1-9 (A) y MIN-6 (D). En la gráfica se muestra los resultados de la cuantificación de las proteínas LC3-II (14-16 kDa) y p62 (62 kDa) y área bajo la curva (AUC) de dichos gráficos en α TC1-9 (B y C) y en MIN-6 (E y F). Los valores se normalizaron por el control de carga, α -Tubulina (55kDa). Los gráficos muestran la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Seguidamente, se comparó el efecto del pre-tratamiento con IFN α y el bloqueo del flujo autofágico con **bafilomicina A1 (Figura 15)**. El tratamiento con bafilomicina llevó a la acumulación tanto de LC3-II como de p62 (**Figuras 15A y D**). Este incremento en la expresión de las proteínas LC3-II como de p62 se redujo si las células habían estado expuestas al pre-tratamiento con IFN α en la línea células α -TC19 (**Figura 15A, B y C**). Sin embargo, aunque hay una disminución de aproximadamente un 40% en la expresión de p62 en las células α tratadas con IFN α cuando comparadas a las células control (NT), estas diferencias no llegaron a ser significativas (**Figura 15C**). Por otro lado, no se apreciaron diferencias en la línea celular MIN-6 bajo las mismas condiciones, como se puede observar en las **Figuras 15D-F**.

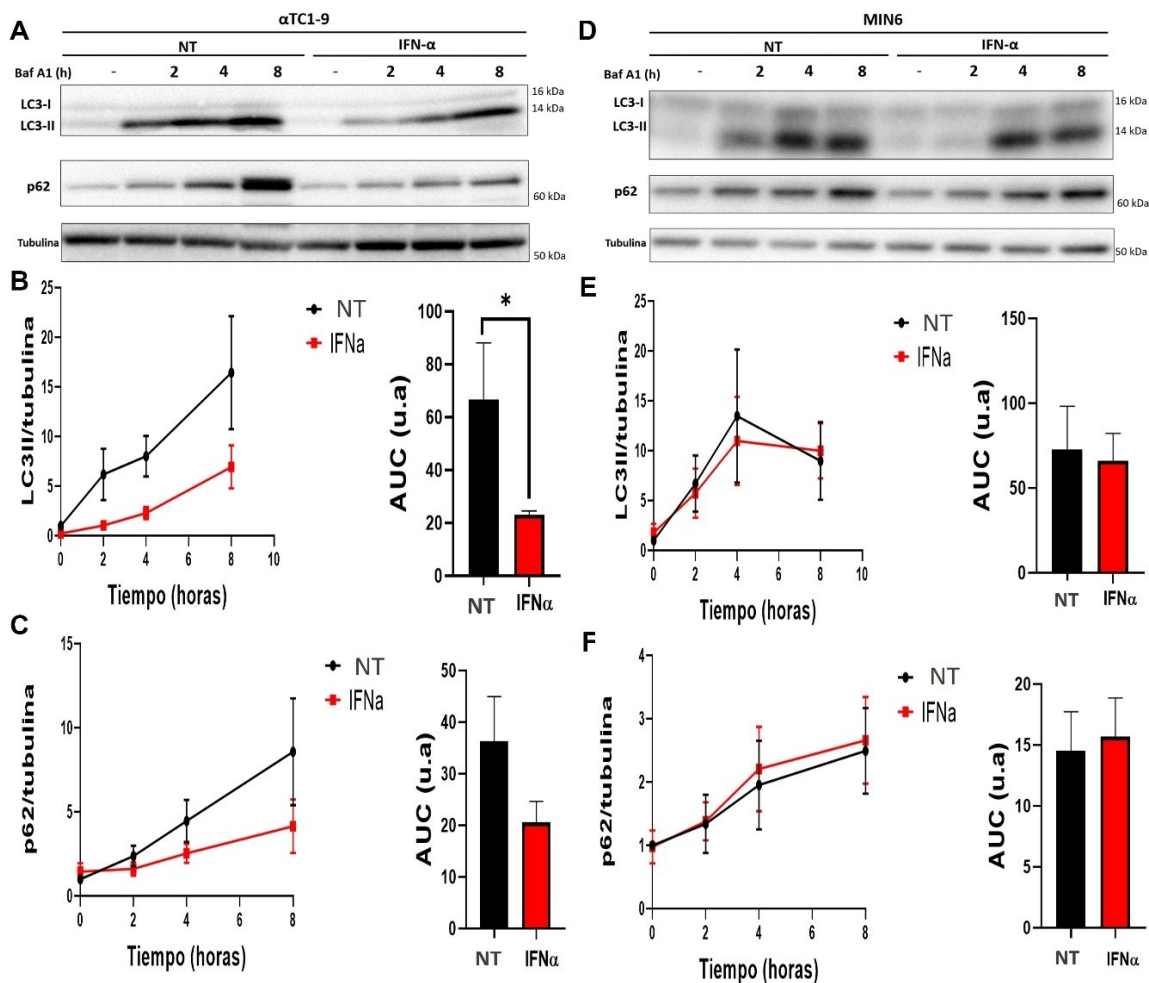


Figura 15. Efecto del pre-tratamiento con IFN α y el bloqueo de la autofagia con bafilomicina A1 sobre las proteínas LC3-I/II y p62 en α TC1-9 y MIN-6. Células α TC1-9 (A,B,C) y MIN-6 (D,E,F) fueron pre-tratadas con IFN α (1000 U/ml, rojo) o no (NT, negro) durante 24 h y posteriormente fueron tratadas con bafilomicina A1 (100 nM) y conjuntamente con IFN α (1000 U/ml) o vehículo (DMSO) durante 8 h adicionales. Las muestras se recolectaron en los tiempos indicados en la figura (0, 2, 4 y 8 horas). Imagen de Western blot representativa de células α TC1-9 (A) y MIN-6 (D). En la gráfica se muestra los resultados de la cuantificación de las proteínas LC3-II (14-16 kDa) y p62 (62 kDa) y área bajo la curva (AUC) de dichos gráficos en α TC1-9 (B y C) y en MIN-6 (E y F). Los valores se normalizaron por el control de carga, α -Tubulina (55kDa). Los gráficos muestran la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. * $p \leq 0,05$ t-test IFN α vs. Vehículo ambos tratados con bafilomicina A1.

Tras el tratamiento con **cloroquina** en ausencia de IFN α , se observó una acumulación de LC3-II y de p62 en ambas líneas celulares (**Figuras 16A y D**). Así como en el tratamiento con bafilomicina A1, las células α -TC19 tratadas con IFN α presentaron una disminución de LC3-II con respecto a la condición control. Sin embargo, a pesar de la reducción de un 50% en la expresión de LC3-II, estas diferencias no llegaron a alcanzar significancia estadística, probablemente por la gran dispersión existente entre los diferentes experimentos (**Figuras 16B**). Además, a diferencia del tratamiento con bafilomicina A1, no se observaron diferencias en la expresión de p62 (**Figura 16C**). A su vez, en la línea celular MIN-6 no se apreciaron diferencias en la acumulación de las proteínas LC3-II y de p62 relacionadas con el tratamiento con IFN α (**Figura 14E y F**).

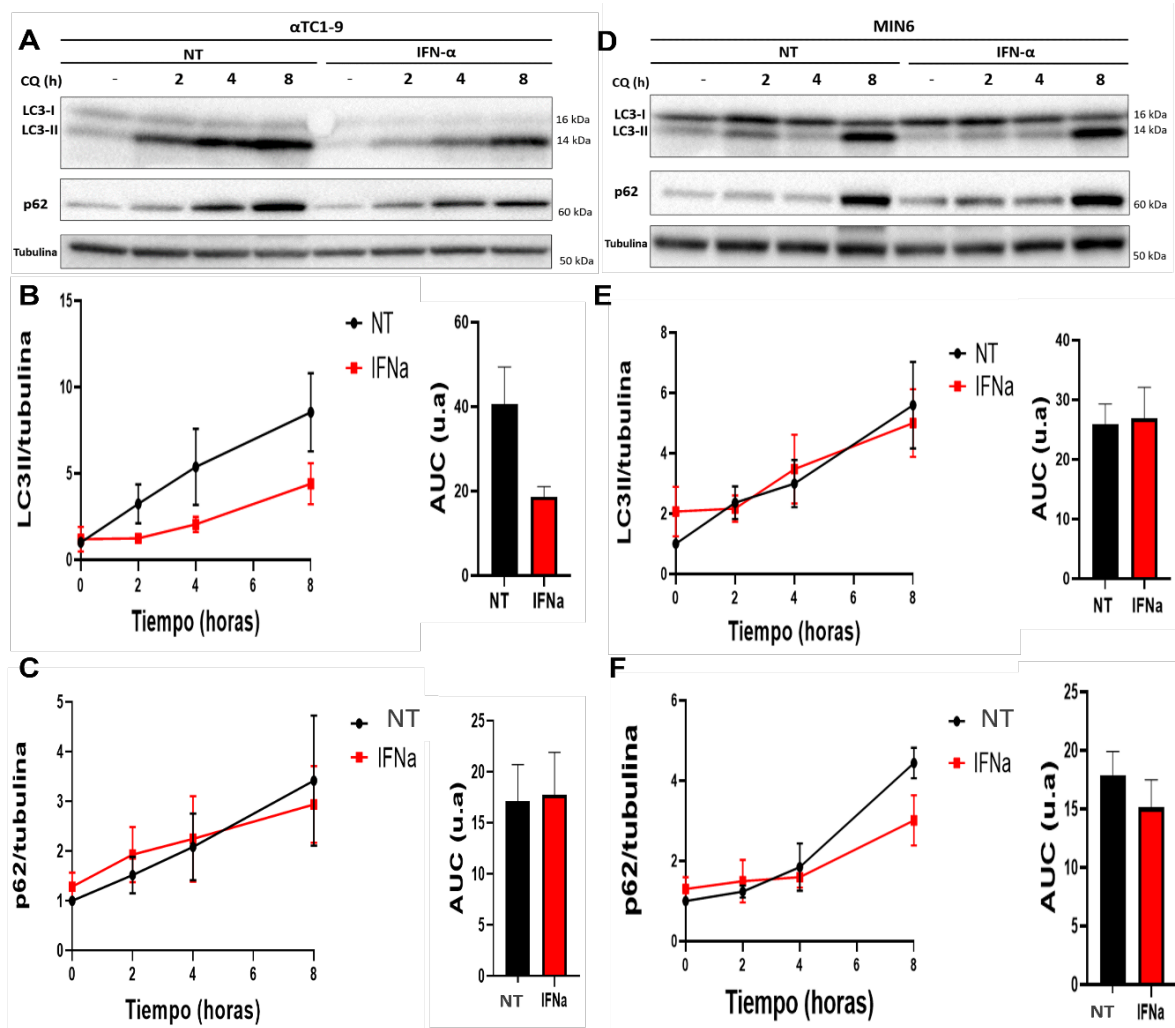


Figura 16. Efecto del pre-tratamiento con IFN α y el bloqueo de la autofagia con cloroquina sobre las proteínas LC3-I/II y p62 en α TC1-9 y MIN-6. Células α TC1-9 (A,B,C) y MIN-6 (D,E,F) fueron pre-tratadas con IFN α (1000 U/ml, rojo) o no (NT, negro) durante 24 h y posteriormente fueron tratadas con cloroquina (10 μ M) conjuntamente con IFN α (1000 U/ml) o vehículo (DMSO) durante 8 h adicionales. Las muestras se recolectaron en los tiempos indicados en la figura (0, 2, 4 y 8 horas). Imagen de Western blot representativa de células α TC1-9 (A) y MIN-6 (D). En la gráfica se muestra los resultados de la cuantificación de las proteínas LC3-II (14-16 kDa) y p62 (62 kDa) y área bajo la curva (AUC) de dichos gráficos en α TC1-9 (B y C) y en MIN-6 (E y F). Los valores se normalizaron por el control de carga, α -Tubulina (55kDa). Los gráficos muestran la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Por último, las células fueron tratadas con **rapamicina**, inhibidor de mTOR que produce una aceleración del flujo autofágico. Esta aceleración, tal y como se ha mencionado al inicio de los resultados, debería llevar a mayor expresión de la proteína LC3-II y a una mayor degradación de p62 (**Figura 17A y D**). En células α -TC19, el tratamiento con IFN α disminuyó la expresión de LC3-II y p62 a todos los tiempos testados si lo comparamos con el mismo tipo celular tratado con rapamicina pero sin exposición a IFN α , lo que sugiere que el IFN α produce una ralentización del flujo autofágico en α -TC19 (**Figura 17A, B y C**). Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en la línea celular MIN-6 bajo las mismas condiciones (**Figura 17D, E y F**).

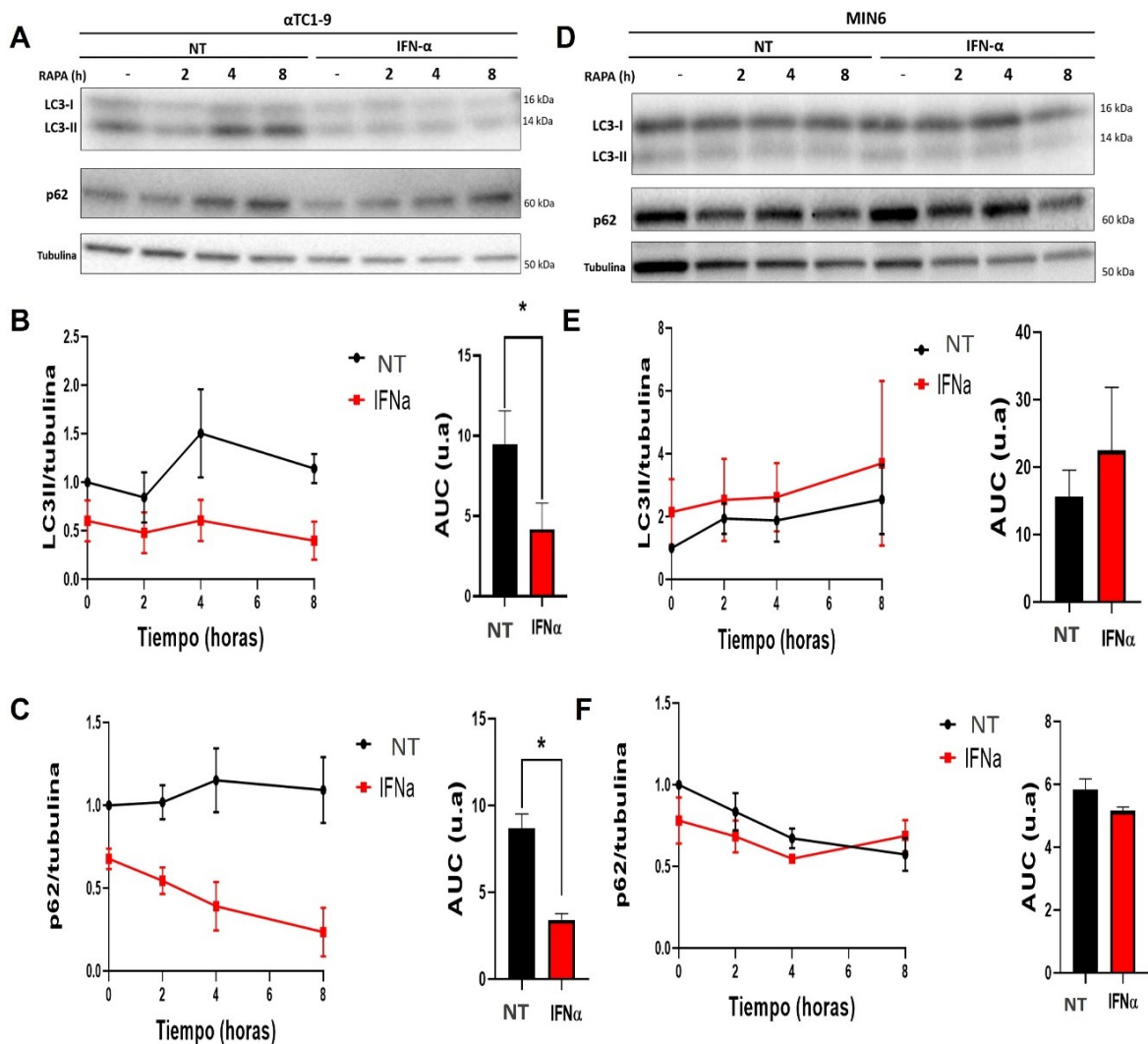
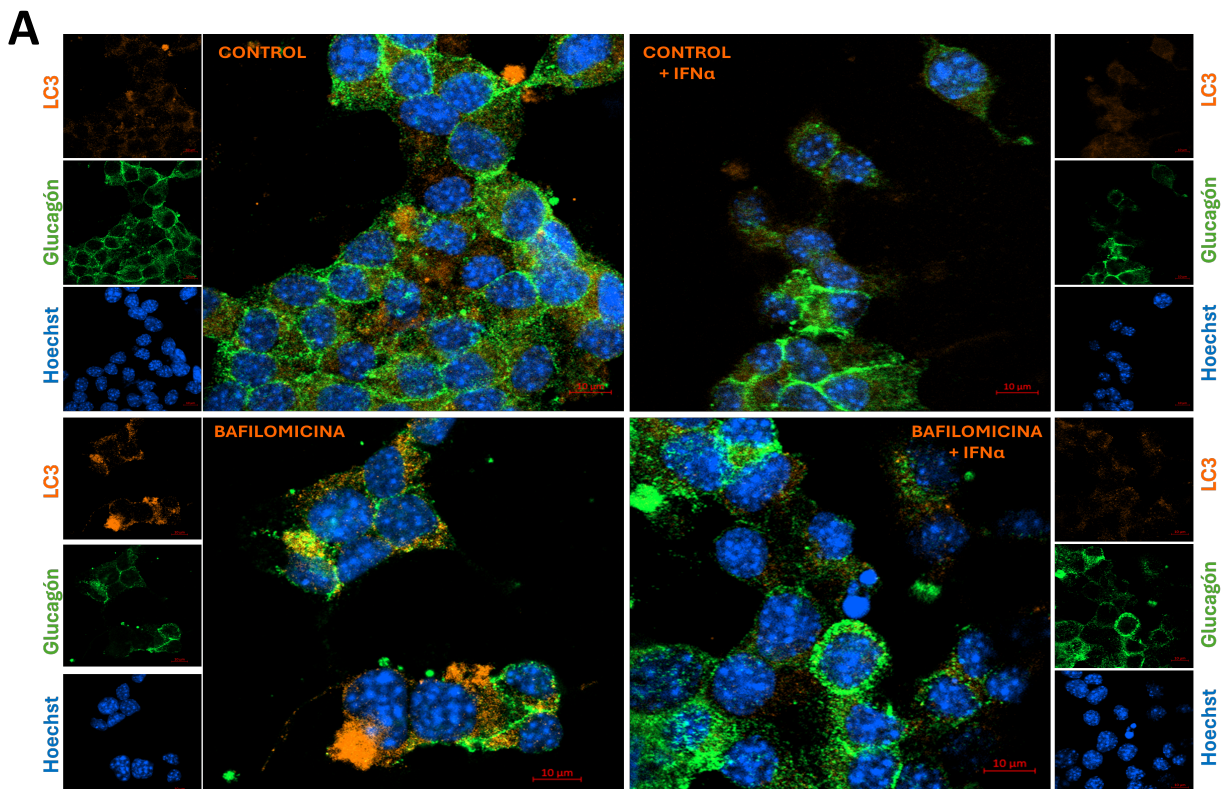


Figura 17. Efecto del pre-tratamiento con IFN α en la aceleración de la autofagia con rapamicina en α TC1-9 y MIN-6. Células α TC1-9 (A,B,C) y MIN-6 (D,E,F) fueron pre-tratadas con IFN α (1000 U/ml, rojo) o no (NT, negro) durante 24 h y posteriormente fueron tratadas con rapamicina (50 nM) conjuntamente con IFN α (1000 U/ml) o vehículo (DMSO) durante 8 h adicionales. Las muestras se recolectaron en los tiempos indicados en la figura (0, 2, 4 y 8 horas). Imagen de Western blot representativa de células α TC1-9 (A) y MIN-6 (D). En la gráfica se muestra los resultados de la cuantificación de las proteínas LC3-II (14-16 kDa) y p62 (62 kDa) y área bajo la curva (AUC) de dichos gráficos en α TC1-9 (B y C) y en MIN-6 (E y F). Los valores se normalizaron por el control de carga, α -Tubulina (55kDa). Los gráficos muestran la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ t-test IFN α vs. Vehículo ambos tratados con rapamicina.

5.4. El IFN α disminuyó la acumulación de LC3 en α TC1-9 pero no en MIN-6

Después de haber evaluado los efectos del IFN α sobre la expresión de LC3 en las células MIN-6 y α TC1-9 sometidas al tratamiento con bafilomicina A1 mediante western blot, se decidió confirmar los resultados y estudiar la localización subcelular de esta proteína mediante inmunofluorescencia (ICF) bajo las mismas condiciones (**Figura 18**).

El ensayo de ICF reveló que, tanto en la ausencia como en la presencia de bafilomicina A1, el tratamiento del IFN α disminuyó la acumulación de LC3 en comparación con la situación control. La bafilomicina produjo un aumento en la expresión de LC3 en células α no tratadas con IFN α (**Figura 18A**). En cambio, en la línea celular MIN-6, no se aprecia una diferencia en la acumulación de LC3 tras el tratamiento de IFN α con o sin combinación con bafilomicina A1 con respecto a las condiciones control. La bafilomicina aumentó los niveles de LC3 en MIN-6 (**Figura 18B**). Cabe destacar que en células α TC1-9 que expresaron altas cantidades de LC3 disminuyeron la expresión de la hormona glucagón. Por otro lado, en células MIN-6 el aumento de la expresión de la proteína LC3 no correlacionó con una disminución de la expresión de insulina, y ambas proteínas tienen un patrón similar de expresión, lo que podría indicar la co-expresión de ambas proteínas en este tipo celular.



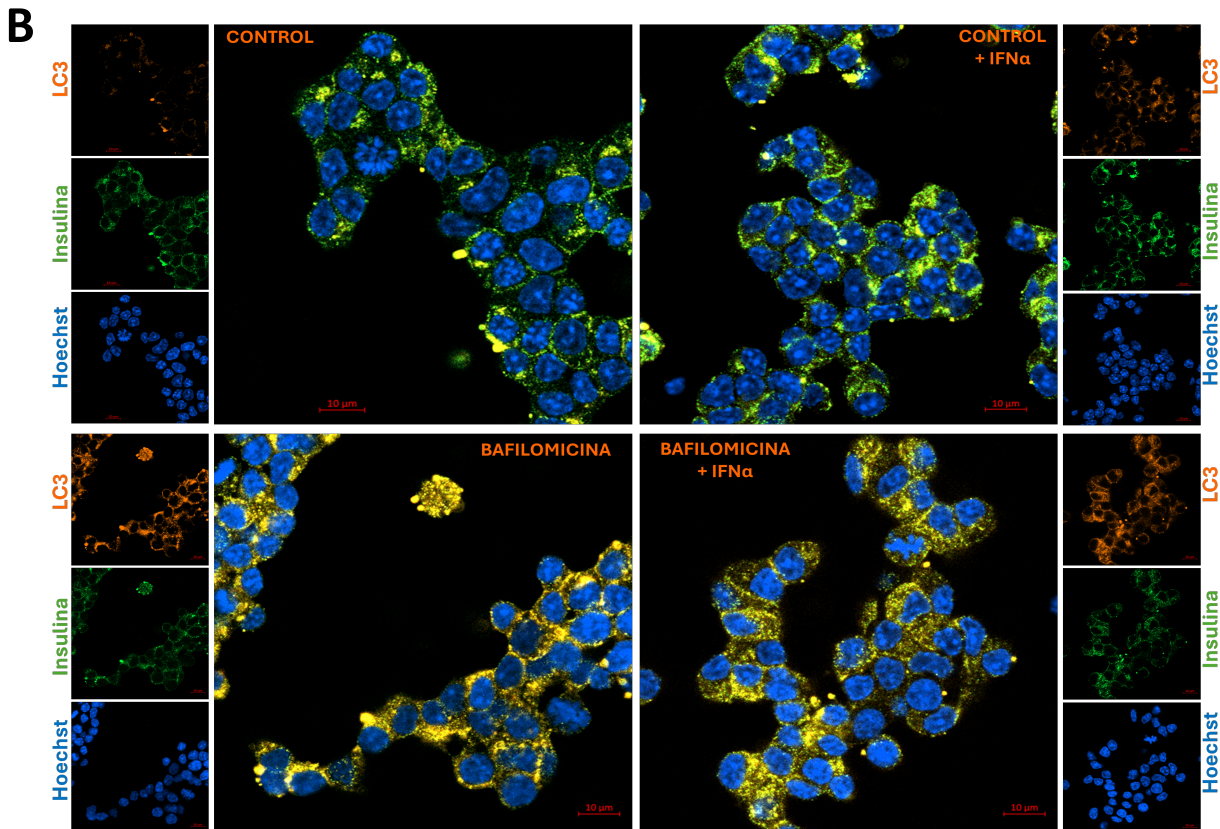


Figura 18. Expresión de LC3 en células α TC1-9 y MIN-6 tratadas con bafilomicina A1 y expuestas a $\text{IFN}\alpha$. Células α TC1-9 (a) y MIN-6 (b) fueron pre-tratadas con $\text{IFN}\alpha$ (1000U/ml) o no (control) durante 24 horas. Al día siguiente las células fueron tratadas con vehículo (DMSO) o bafilomicina A1 (100 nM) en la ausencia o presencia de $\text{IFN}\alpha$ (1000 U/ml). Los núcleos se visualizaron mediante tinción Hoechst (azul), la proteína LC3 (rojo) y el glucagón (verde, A) y la insulina (verde, B).

5.5. Estudio del efecto la modulación de la autofagia tras la exposición a $\text{IFN}\alpha$ en la viabilidad celular de células α TC1-9 y MIN-6

Para investigar si el $\text{IFN}\alpha$ en combinación con la modulación de la autofagia afectaba a la viabilidad celular en las líneas celulares α TC1-9 y MIN-6, se pre-trataron ambas líneas celulares con $\text{IFN}\alpha$ durante 24 horas y posteriormente se trataron con bafilomicina A1 (100 nM), cloroquina (10 μM) y rapamicina (50 nM), en presencia o ausencia de $\text{IFN}\alpha$, durante 16 h. La viabilidad celular se evaluó con las sondas fluorescentes Hoechst (HO) y ioduro de propidio (PI).

En células α pancreáticas en ausencia de $\text{IFN}\alpha$, la inhibición del flujo autofágico con bafilomicina A1 y cloroquina aumentó la apoptosis celular de $6,1 \pm 0,4$ % (Veh) a $8,7 \pm 0,9$ % (BafA1) y $9,2 \pm 1,0$ % (CQ), respectivamente. El aumento del flujo autofágico, con rapamicina, fue el tratamiento que más aumentó la apoptosis en ausencia de $\text{IFN}\alpha$ ($11,9 \pm 0,2$ %) en células α TC1-9 (**Figura 19A**). El incremento en la apoptosis basal, se vio reflejado en un incremento significativo en

la apoptosis tras la exposición al IFN α con todos los tratamientos, de $17,6 \pm 0,6$ % (IFN α) a $21,4 \pm 1,1$ % (BafA1), $22,7 \pm 0,6$ % (CQ) y $22,2 \pm 0,2$ % (Rapa), respectivamente (**Figura 19A**).

En cambio, las células β pancreáticas mostraron un perfil de apoptosis muy diferente. Por un lado, la inhibición del flujo autofágico mediante la exposición a bafilomicina A1 incrementó la apoptosis con respecto al vehículo en ausencia de IFN α , de $5,1 \pm 0,9$ % (Veh) a $10,7 \pm 0,7$ % (BafA1). Mientras que aquellas que fueron pre-tratadas con IFN α incrementaron la apoptosis de $13,3 \pm 0,6$ % (Veh) a $19,1 \pm 0,4$ % (BafA1) (**Figura 19B**). Por otro lado, las células MIN-6 fueron especialmente sensibles al tratamiento con cloroquina, provocando el 100% de apoptosis independientemente de la presencia o no de IFN α . La estimulación de la autofagia con rapamicina en condiciones basales aumentó, de forma no estadísticamente significativa la apoptosis celular ($5,1 \pm 0,9$ % (Veh) y $10,3 \pm 1,3$ % (Rapa)), por otro lado, en células expuestas a IFN α la apoptosis se redujo por debajo de los niveles basales, rapamicina no expuestas a IFN α ($8,6 \pm 2,4$ %) (**Figura 19B**).

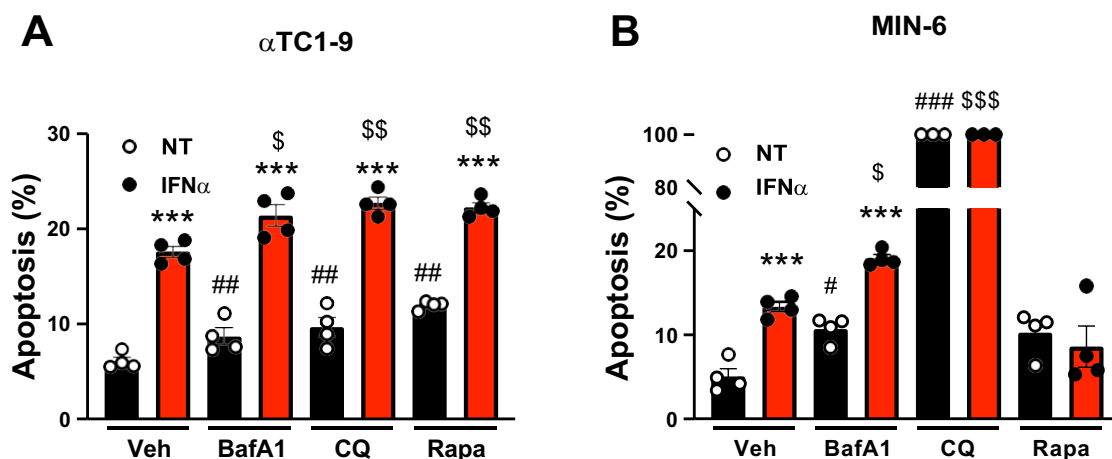


Figura 19. Efectos del IFN α en la modulación de la autofagia en la viabilidad de células α TC1-9 y MIN-6. Células α TC1-9 (A) y MIN-6 (B) fueron pretratadas durante 24 h con IFN α (1000 U/ml). Al día siguiente fueron tratadas con vehículo (DMSO), Baf A1 (100 nM), CQ (10 μ M) y Rapa (50 nM) (barras negras) o en combinación con IFN α (barras rojas) durante 16 horas. Los resultados son medias \pm SEM de cuatro experimentos independientes. *** p \leq 0,001 IFN α vs. NT en cada uso de los tratamientos; # p \leq 0,05, ## p \leq 0,01, ### p \leq 0,001 tratamientos vs. Veh; & p \leq 0,05, && p \leq 0,01, &&& p \leq 0,001 tratamientos vs. IFN α . One-way ANOVA.

Como conclusión de esta parte, podemos decir que el bloqueo de la autofagia disminuye la viabilidad de las células α y β , tanto en presencia como en ausencia de IFN α , mientras que la estimulación de la autofagia aumentó la apoptosis de células no expuestas a IFN α en ambos tipos celulares, pero protegió a las células β frente a la apoptosis inducida por IFN α .

6. DISCUSIÓN

En la DT1, enfermedad que se aborda en este TFM se ha descrito que la liberación de citoquinas y quimioquinas desencadenan una cascada de eventos inmunitarios que resultan en la destrucción de las células β . Cuando el sistema inmunitario detecta la presencia de un desencadenante, como una infección viral, estas moléculas se liberan en el entorno pancreático. Se ha evidenciado que los IFN-I, citoquinas determinantes en las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas, actúan como un nexo clave entre los factores genéticos y ambientales que desencadenan la DT1. Dentro de este tipo de IFN, se ha descrito que el IFN α está implicado en las primeras etapas de la DT1 y que sus vías de señalización están implicadas en la inducción de estrés en el RE, la insulinitis y la hiperexpresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y cambios postranscripcionales así como postraduccionales, causas que facilitan el reconocimiento autoinmune por las células T CD8⁺ (Eizirik & Colli, 2020; Marroqui et al., 2021). Sin embargo, los detalles precisos de cómo estos factores desencadenan la apoptosis no están completamente claros. Uno de los principales contribuyentes a la disfunción y apoptosis de las células β es el estrés del RE. Distintas investigaciones apuntan que la autofagia se potencia como una vía de señalización en respuesta al estrés del RE (Quan, Lim, et al., 2012; Yin et al., 2012). Este proceso es de gran importancia para la eliminación de proteínas y orgánulos dañados, así como para la respuesta celular al estrés y la conservación de la energía. En el contexto de la DT1, estudios anteriores han descrito evidencias de alteración del flujo autofágico en islotes de ratones diabéticos no obesos (NOD), describiendo la existencia de un deterioro en el paso final de degradación autofágica evidenciado por una disminución en la co-localización de LC3 y LAMP1 (los cuáles son marcadores respectivos de autofagosoma y lisosoma) en ratones NOD (Muralidharan et al., 2021). El aumento de autofagosomas en células β de donantes con autoanticuerpos positivos, sugiere que el deterioro de la autofagia podría ocurrir antes del desarrollo clínico de la enfermedad (y por lo tanto aparición de la hiperglicemia), y que este deterioro puede ser debido a una disfunción lisosómica (Muralidharan et al., 2021). Sin embargo, los estudios actuales no aclaran completamente si el deterioro de la autofagia es una causa o una consecuencia de la hiperglucemia. Como consecuencia, en los últimos años el proceso de autofagia ha generado un gran interés en el ámbito científico y se ha postulado como un objetivo prometedor para desarrollar terapias que no solo preserven la función de las células β , sino que también modulen la respuesta inmunitaria para prevenir el ataque autoinmune en la DT1 (Prasad et al., 2023).

El objetivo principal de este trabajo ha sido investigar el papel de la autofagia tras la exposición a IFN α tanto en células β como en células α pancreáticas, para ello se utilizaron las líneas celulares de ratón MIN-6 y α TC1-9, respectivamente. Esta citoquina está implicada en las primeras etapas de la DT1 y se ha descrito que actúa estimulando la autofagia en líneas cancerosas como Daudi (células B de linfoma humano), HeLa (células epiteliales de cáncer cervical humano), MDA-MB-231 (células de carcinoma mamario humano), entre otras (Schmeisser et al., 2014).

En base a los resultados preliminares del análisis de RNA-seq en el que se analizaron distintos genes implicados en las etapas de autofagia que eran expresados en células α y β pancreáticas de islotes de ratón no tratados y tratados con IFN α durante 24 horas (**Figura 6**), se pudo comprobar una expresión diferencial de estos genes entre células α y β al someter a los islotes al tratamiento o no con IFN α , sugiriendo diferentes adaptaciones de la autofagia a esta citoquina en estos dos tipos celulares. En la etapa de iniciación, observamos una disminución en la expresión de *Ulk1* entre células α y β y una disminución de *Ulk2* entre células α sin tratar y tratadas con IFN α . Los genes *Ulk1* y *Ulk2* están implicados en la iniciación de la autofagia. La disminución en su expresión sugiere una regulación a la baja del proceso autofágico, lo que podría estar relacionado con la respuesta al estrés inducido por el tratamiento con IFN α (**Figura 6**, datos no publicados). Las diferencias observadas entre células α y β podrían indicar diferente susceptibilidad y regulación de la autofagia por estas células. También se vieron diferencias significativas en genes relacionados con la nucleación (*Atg14* y *Wipi1*) y en la etapa de elongación (*Atg12*) entre células α y β tratadas, o no, con IFN α . Estas diferencias observadas, entre los dos tipos celulares, en todas las etapas de la autofagia tras el tratamiento con IFN α nos llevó a profundizar en el efecto de esta citoquina sobre el flujo autofágico en células α y β del páncreas.

Esto nos llevó a investigar de qué manera el IFN α actuaba regulando la expresión diferencial de estos genes y como una gestión diferencial de la autofagia entre células α y β podría afectar en los primeros estadios de la enfermedad, lo que podría explicar por qué las células α sobreviven mientras las células β perecen en el desarrollo de la DT1 (Eizirik et al., 2023; Martínez et al., 2021).

El efecto de la combinación de las citoquinas IL-1 β y el IFN- γ en el flujo autofágico fue descrito en 2018 por Lambelet et al, donde encontraron que estas citoquinas estimulan los primeros pasos de la autofagia en células INS-1E, una línea celular de células β de rata, ya que activan la vía AMPK-ULK-1 e inhiben mTORC1. Sin embargo, bloquean aguas abajo el flujo autofágico, lo que potencia el estrés del RE (Lambelet et al., 2018). Otro estudio publicado en Bioarxiv, evidenció un deterioro en el flujo autofágico inducido por IFN α en ratones NOD hembras prediabéticos (Melnik et al., 2023). No obstante, ninguno de estos trabajos estudia cómo afecta la

autofagia a las células α . Estudiar la autofagia en células α es de gran relevancia, ya que a diferencia de las células β , las células α sobreviven durante el desarrollo de la DT1, aunque ambos tipos celulares son disfuncionales (Eizirik et al., 2023). En este TFM, se ha estudiado como cambios diferenciales en el flujo autofágico inducidos por $\text{IFN}\alpha$ podría afectar a la función y supervivencia de las células α y β pancreáticas.

El primer paso fue estudiar el flujo autofágico entre ambos tipos celulares mediante el uso de los compuestos moduladores del flujo autofágico, ya sean inhibidores del flujo (bafilomicina y cloroquina) o activadores del flujo autofágico (rapamicina) (Chicote et al., 2020). Tal como se muestra en la **Figura 9**, el tratamiento bafilomicina A1 durante 24 horas bloqueó el flujo autofágico en células $\alpha\text{TC1-9}$ y MIN-6, como se evidencia por la acumulación de la proteína LC3-II en comparación con tubulina y la acumulación de p62, tal y como se muestra en otros tipos celulares como MG63 (línea celular de osteosarcoma) (Xie et al., 2014) y HT-29 (línea celular de adenocarcinoma de colon humano) (Wu et al., 2009). Con respecto al tratamiento con cloroquina, un segundo inhibidor del flujo autofágico, este induce la acumulación de LC3-II y p62 de manera similar a la bafilomicina A1, resultados que fueron coherentes con los observados en las células $\alpha\text{TC1-9}$. Sin embargo, el tratamiento con cloroquina no aumentó la expresión de LC3-II en células MIN-6. El tratamiento de estos compuestos durante 24 horas puede no ser concluyente, ya que como han expuesto por otros autores en células HEK293 (células derivadas de riñón embrionario humano) (Sarkar et al., 2009), la duración del tratamiento con los inhibidores de la autofagia bafilomicina A1 o cloroquina debe estar comprendida entre 1 y 4 horas para obtener datos más fiables, ya que la exposición prolongada a estos inhibidores puede causar una acumulación excesiva de productos de degradación, lo que puede llevar a disfunción y a toxicidad celular. Esta acumulación puede reducir la viabilidad celular al interferir con los procesos normales de degradación y reciclaje de desechos celulares (Kaur & Debnath, 2015).

En cualquier caso, en base a estos resultados podemos concluir que nuestros modelos celulares se comportan dentro de lo esperado y pueden ser usados como modelo experimental para el estudio del efecto del $\text{IFN}\alpha$ en la autofagia de células α y β pancreáticas (**Figura 9**). El mayor efecto inhibitorio del flujo autofágico se produjo tras el tratamiento con bafilomicina A1, observado en ambas líneas celulares, que podría explicarse ya que actúa inhibiendo la V-ATPasa mediante interacción directa con la enzima (Mauvezin & Neufeld, 2015), lo cual bloquea completamente la función de los lisosomas. Por su parte, la cloroquina no impide tan efectivamente la degradación de los componentes autofágicos ya que este compuesto eleva el pH de los lisosomas, lo que reduce su capacidad enzimática para degradar proteínas y otros materiales autofágicos (Mauthe et al., 2018). Por su parte, la rapamicina, al inhibir mTOR, induce la autofagia, lo que aumenta la

conversión de LC3-I a LC3-II debido a la formación de nuevos autofagosomas. Sin embargo, la rapamicina generalmente no conduce a la acumulación de p62, ya que este marcador se degrada dentro de los autofagolisosomas. Por lo tanto, mientras que LC3-II aumenta, los niveles de p62 tienden a disminuir debido a la mayor actividad autofágica (Chicote et al., 2020). El tratamiento con rapamicina no aumentó los niveles de LC3-II como se esperaba (Bartolome et al., 2012) en la línea celular MIN-6, esto podría deberse a que LC3-II puede ser degradado a lo largo del tiempo, y su nivel puede disminuir a las 24 horas dependiendo de la actividad autofágica (**Figura 9**) (Klionsky et al., 2016).

Una vez probamos la eficacia de los fármacos empleados en el flujo autofágico de nuestros modelos in vitro, se investigó el efecto de IFN α en este proceso, para ello se decidió estudiar la acumulación de estas proteínas en función del tiempo. Por lo que se analizó la expresión de las proteínas LC3-I, LC3-II y p62 tras 2, 4 y 8 h en respuesta al tratamiento con IFN α .

En primer lugar, se propuso una aproximación experimental en la cual se co-trató las células α y β con IFN α y los compuestos moduladores de la autofagia. Cuando los compuestos moduladores de la autofagia (bafilomicina A1, cloroquina, rapamicina) fueron añadidos al medio al mismo tiempo que el IFN α no se encontraron diferencias significativas en la línea celular α TC1-9 (**Figura 11A, Figura 12A,C,E**) ni en la línea MIN-6 (**Figura 11B, Figura 12B,D,F**). Esto podría deberse a que el tiempo de exposición de las muestras al IFN α no fue suficiente para inducir cambios en la autofagia. El IFN α es una citoquina proinflamatoria cuya función principal es proteger a las células frente a una posible infección viral y alertar a las células adyacentes del peligro (Jean-Baptiste et al., 2017). Los efectos descritos del IFN α son principalmente efectos transcripcionales, que implican la transcripción de genes de respuesta a interferón (ISGs) y la traducción de estas proteínas, generalmente hablamos de cientos de proteínas de la respuesta antiviral (Hultcrantz et al., 2007; Lind et al., 2013). Estudios transcripcionales en células β humanas, EndoC- β H1, tratadas con IFN α muestran que el máximo de expresión de ISGs causadas por esta citoquina se encuentra en torno a 24 h (Colli et al 2020; Coomans de Brachène et al., 2024). Por otro lado, se ha descrito que la línea celular de células β humanas EndoC- β H1 tratada con IFN α durante 24 h aumentó los marcadores de estrés de RE lo que, tal y como se describe en la introducción, podría ser un mecanismo modulador de la autofagia (Marroqui et al., 2017). Basándonos en estos estudios previos, y teniendo en cuenta que estudios que investigaron el flujo autofágico en células β de rata INS1-E mediante tratamiento con cloroquina y torin1, un estimulador del flujo autofágico, combinados con un pre- tratamiento con IL-1 β e IFN- γ , citoquinas también relacionadas con la DT1 pero en estados más avanzados (Pirot et al., 2008), mostraron alteraciones en el flujo autofágico (Lambelet et al., 2018), se realizó un pre-tratamiento de 24 h con IFN α .

El pretratamiento de 24 h de IFN α seguido de 8 h de IFN α con los compuestos moduladores de autofagia, mostró cambios significativos disminuyendo el flujo autofágico con bafilomicina A1 y rapamicina en α -TC19, pero no en MIN6 (**Figura 15 y 17**). En este caso, la disminución de la expresión de la proteína LC3-II podría deberse a que el IFN α estaría actuando como un bloqueador de la síntesis de autofagosomas y de este modo las células α presentarían una autofagia defectuosa, tal y como se mostró en células HeLa (Streeter et al., 2016). Con respecto al efecto de la combinación farmacológica de cloroquina e IFN α , nuestros resultados en las células α -TC19 tratadas con IFN α presentaron una disminución de LC3-II con respecto a la condición control, aunque no fue estadísticamente significativa dado el número limitado de experimento y la alta variabilidad de los datos (**Figura 16**). A su vez en la línea celular MIN-6 no se apreciaron diferencias en la expresión de LC3-II y de p62 bajo las condiciones control y el tratamiento con IFN α (**Figuras 14-17**). Estos resultados se encuentran en consonancia con los resultados con cloroquina descritos por Lambelet y colaboradores (Lambelet et al., 2018), que demuestran que los niveles de LC3-II y p62 aumentaron ligeramente pero no de manera significativa en presencia de cloroquina tras el tratamiento con las citoquinas IL1- β e IFN- γ en células INS1-E. Los resultados obtenidos con los inhibidores de la autofagia nos sugieren que el IFN α ralentiza el flujo autofágico en α TC1-9, pero no en MIN-6. En relación a los resultados obtenidos tras el tratamiento con el estimulador de autofagia, rapamicina, se observa una disminución de LC3-II en la presencia de IFN α (**Figura 17**) lo que podría explicarse nuevamente como una ralentización del flujo autofágico en células α TC1-9 provocado por la exposición al IFN α . Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas en la línea celular MIN-6 expuestas a las mismas condiciones (**Figura 17**).

Los resultados obtenidos con la bafilomicina A1 fueron confirmados por experimentos de inmunofluorescencia (**Figura 18**). El efecto de IFN α en la expresión de la proteína LC3 se analizó mediante ICF, empleando bafilomicina A1 como inhibidor de la autofagia en células MIN-6 y α TC1-9. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento del IFN α disminuyó la acumulación de LC3 en comparación con la situación control tanto en la ausencia como en la presencia de bafilomicina A1 en la línea celular α TC1-9. A su vez, no se aprecia una diferencia en la acumulación de LC3 tras el tratamiento de IFN α con o sin combinación con bafilomicina A1 con respecto a las condiciones control en la línea celular MIN-6. Estos resultados estuvieron en discordancia con los que obtuvieron por Lambelet y colaboradores, en los que se sugiere que las citoquinas aumentaban la acumulación de LC3 y p62 indicando acumulación de vacuolas autofágicas en células INS-1E (Lambelet et al., 2018), cabe destacar en este punto que las citoquinas usadas en este caso fue un cóctel de IL-1 β + IFN γ , las cuales activan vías de señalización diferentes al IFN α . Otro factor que puede influir, es que el modelo de línea celular usado correspondía a una línea celular derivada

de insulinoma de rata, y en nuestro caso la línea células deriva de células β de ratón. Nada está descrito en la literatura sobre el efecto de estos tratamientos en la autofagia de células α .

Los datos de viabilidad celular mostrados en la **Figura 19** nos indican que el bloqueo de la autofagia ejercido por bafilomicina A1 y cloroquina induce la apoptosis en células α en ausencia de IFN α , y potencia la apoptosis de estas células inducida por IFN α . Curiosamente, el tratamiento con rapamicina, un estimulador de la autofagia también indujo muerte celular. Se propone que en células α la estimulación de la autofagia puede conducir a la muerte celular, por lo que el bloqueo del flujo autofágico podría ser un mecanismo de supervivencia en células α .

Otros autores han expuesto que la autofagia excesiva por rapamicina puede conducir a la apoptosis celular tanto en islotes aislados cultivados obtenidos de ratones C57BL/6 como en células β pancreáticas de ratones transgénicos con proteína fluorescente verde-proteína asociada a LC3 (GFP)–LC3 (Tanemura et al., 2012). Aunque el aumento del flujo autofágico puede contribuir a la supervivencia celular, en ciertos contextos también puede facilitar la activación de la muerte celular programada, por lo que la autofagia excesiva podría ser tan perjudicial como la autofagia defectuosa (Maiuri et al., 2007). Esto ocurre porque la autofagia, aunque generalmente es un proceso que ayuda a las células a sobrevivir al reciclar sus componentes dañados, no siempre actúa de manera protectora. Si la célula se enfrenta a un exceso de materiales que necesitan ser degradados, y la capacidad del sistema autofágico para procesar y eliminar estos materiales se ve superada, puede llevar a una acumulación peligrosa de productos autofágicos. Esta acumulación descontrolada puede alterar el equilibrio interno de la célula, activando mecanismos que desencadenan la muerte celular en lugar de protegerla, es decir, cuando la autofagia se vuelve excesiva o ineficaz, puede provocar la destrucción de la célula en lugar de su supervivencia (Fujitani et al., 2010; Tanemura et al., 2012). Estos hallazgos sugieren una interacción compleja entre la autofagia y la apoptosis, con múltiples conexiones entre estos procesos y la muerte celular (Masini et al., 2009).

Si nos centramos en los resultados obtenidos con la línea celular MIN-6 podemos ver que esta fue mucho más sensible, desde el punto de vista de la viabilidad, a los tratamientos moduladores de la autofagia, en especial al tratamiento con cloroquina, que produjo un porcentaje de células apoptóticas del 100% tanto en presencia como en ausencia de IFN α . Esto podría ocurrir, ya que la acumulación de autofagosomas no degradados provoca estrés celular, lo que puede desencadenar la apoptosis exacerbada. Este efecto puede ocurrir independientemente de la presencia de otros tratamientos, como el IFN α (De Sanctis et al., 2023). El bloqueo del flujo autofágico por la exposición a bafilomicina A1 aumentó la apoptosis en presencia y ausencia de

IFN α . Estos resultados están en consonancia con los resultados obtenidos por Lambelet y colaboradores que exponen que el bloqueo de la autofagia con distintos inhibidores en la línea celular INS1-E conduce a un aumento de la apoptosis celular y potencia la apoptosis inducida por IL1- β e IFN- γ (Lambelet et al., 2018). El tratamiento con rapamicina, acelerando el flujo autofágico, tuvo un efecto protector en la viabilidad de las células β . Otros estudios describieron que la rapamicina, al activar la autofagia mediante la inhibición de mTORC1, redujo la apoptosis en células β que había sido inducida por brefeldina o palmitato (Bugliani et al., 2019). Estos resultados están en concordancia con los expuestos por otros autores que proponen que la autofagia es un mecanismo protector en células β que se activa con el fin de proporcionar sustratos energéticos y restablecer la homeostasis celular (Quan, Lim, et al., 2012; Yin et al., 2012).

La literatura científica que describe el efecto de citoquinas sobre el flujo autofágico en la diabetes es reducida. Estos datos sugieren que el IFN α tiene un claro efecto modulando negativamente el flujo autofágico en las células α , sin embargo, no parece ejercer un efecto en las células β . La vía de la autofagia se ha convertido en un objetivo prometedor para la prevención y el tratamiento de la diabetes, ya que regula el mantenimiento de la homeostasis celular de las células β bajo condiciones de estrés. La actuación en los primeros estadios de la DT1 podría contribuir a la conservación de la masa de células β y evitar el avance de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados descritos en este Trabajo Final de Máster podemos concluir que:

- 1) El tratamiento con moduladores del flujo autofágico (bafilomicina A1, cloroquina y rapamicina) son herramientas válidas para el estudio de la autofagia en las líneas celulares α -TC1-9 y MIN-6.
- 2) El co-tratamiento con IFN α y moduladores del flujo autofágico no mostró diferencias significativas ni en las células α -TC1-9 ni en las células MIN-6.
- 3) El pre-tratamiento de 24 h con IFN α redujo el flujo autofágico en la línea celular α -TC1-9, pero no produjo cambios en la línea celular MIN-6.
- 4) La inhibición del flujo autofágico con bafilomicina A1 y cloroquina aumentó la acumulación de LC3-II y p62 en células α -TC1-9 y MIN-6. Este incremento se redujo cuando las células fueron pre-tratadas con IFN α en la línea celular α -TC1-9, pero no en MIN-6, indicando que el IFN α produce un bloqueo en el flujo autofágico aguas arriba impidiendo que esas dos proteínas se acumulen.
- 5) El incremento del flujo autofágico con rapamicina exacerbó las diferencias en la acumulación de LC3-II y p62 en la línea celular α -TC1-9 pre-tratadas con IFN α , mientras que no produjo cambios en la expresión de estas proteínas en la línea celular MIN-6.
- 6) El bloqueo de la autofagia disminuye la viabilidad de las células α y β , tanto en presencia como en ausencia de IFN α , mientras que la estimulación de la autofagia aumentó la apoptosis de células no expuestas a IFN α en las líneas celulares α -TC1-9 y MIN-6, pero protegió a las células β de frente a la apoptosis inducida por IFN α .

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alanentalo, T., Asayesh, A., Morrison, H., Lorén, C. E., Holmberg, D., Sharpe, J., & Ahlgren, U. (2007). Tomographic molecular imaging and 3D quantification within adult mouse organs. *Nat Methods*, 4(1), 31-33. <https://doi.org/10.1038/nmeth985>
- Anquetil, F., Sabouri, S., Thivolet, C., Rodriguez-Calvo, T., Zapardiel-Gonzalo, J., Amirian, N., Schneider, D., Castillo, E., Lajevardi, Y., & von Herrath, M. G. (2017). Alpha cells, the main source of IL-1 β in human pancreas. *J Autoimmun*, 81, 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.03.006>
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet*, 383(9911), 69-82. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)60591-7)
- Bartolome, A., Guillen, C., & Benito, M. (2012). Autophagy plays a protective role in endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic beta cell death. *Autophagy*, 8(12), 1757-1768. <https://doi.org/10.4161/auto.21994>
- Benkahla, M. A., Sabouri, S., Kiosses, W. B., Rajendran, S., Quesada-Masachs, E., & von Herrath, M. G. (2021). HLA class I hyper-expression unmasks beta cells but not alpha cells to the immune system in pre-diabetes. *J Autoimmun*, 119, 102628. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2021.102628>
- Brissova, M., Haliyur, R., Saunders, D., Shrestha, S., Dai, C., Blodgett, D. M., Bottino, R., Campbell-Thompson, M., Aramandla, R., Poffenberger, G., Lindner, J., Pan, F. C., von Herrath, M. G., Greiner, D. L., Shultz, L. D., Sanyoura, M., Philipson, L. H., Atkinson, M., Harlan, D. M., . . . Powers, A. C. (2018). α Cell Function and Gene Expression Are Compromised in Type 1 Diabetes. *Cell Rep*, 22(10), 2667-2676. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.032>
- Bugliani, M., Mossuto, S., Grano, F., Suleiman, M., Marselli, L., Boggi, U., De Simone, P., Eizirik, D. L., Cnop, M., Marchetti, P., & De Tata, V. (2019). Modulation of Autophagy Influences the Function and Survival of Human Pancreatic Beta Cells Under Endoplasmic Reticulum Stress Conditions and in Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10, 52. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00052>
- Cao, W., Li, J., Yang, K., & Cao, D. (2021). An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull Cancer*, 108(3), 304-322. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.11.004>
- Chatterjee, S., Khunti, K., & Davies, M. J. (2017). Type 2 diabetes. *Lancet*, 389(10085), 2239-2251. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30058-2)
- Chicote, J., Yuste, V. J., Boix, J., & Ribas, J. (2020). Cell Death Triggered by the Autophagy Inhibitory Drug 3-Methyladenine in Growing Conditions Proceeds With DNA Damage. *Front Pharmacol*, 11, 580343. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.580343>
- Coomans de Brachène, A., Alvelos, M. I., Szymczak, F., Zimath, P. L., Castela, A., Marmontel de Souza, B., Roca Rivada, A., Marín-Cañas, S., Yi, X., Op de Beeck, A., Morgan, N. G., Sonntag, S., Jawurek, S., Title, A. C., Yesildag, B., Pattou, F., Kerr-Conte, J., Montanya, E., Nacher, M., . . . Eizirik, D. L. (2024). Interferons are key cytokines acting on pancreatic islets in type 1 diabetes. *Diabetologia*, 67(5), 908-927. <https://doi.org/10.1007/s00125-024-06106-7>
- Da Silva Xavier, G. (2018). The Cells of the Islets of Langerhans. *J Clin Med*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>
- De Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, 28, 435-492. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.28.030166.002251>

- De Sanctis, J. B., Charris, J., Blanco, Z., Ramírez, H., Martínez, G. P., & Mijares, M. R. (2023). Molecular Mechanisms of Chloroquine and Hydroxychloroquine Used in Cancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 23(10), 1122-1144. <https://doi.org/10.2174/1871520622666220519102948>
- Dolenšek, J., Rupnik, M. S., & Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), e1024405. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>
- Doliba, N. M., Rozo, A. V., Roman, J., Qin, W., Traum, D., Gao, L., Liu, J., Manduchi, E., Liu, C., Golson, M. L., Vahedi, G., Naji, A., Matschinsky, F. M., Atkinson, M. A., Powers, A. C., Brissova, M., Kaestner, K. H., & Stoffers, D. A. (2022). α Cell dysfunction in islets from nondiabetic, glutamic acid decarboxylase autoantibody-positive individuals. *J Clin Invest*, 132(11). <https://doi.org/10.1172/jci156243>
- Dossou, A. S., & Basu, A. (2019). The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy. *Cancers (Basel)*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/cancers11101422>
- Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., Kawamori, R., Fujitani, Y., & Watada, H. (2008). Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab*, 8(4), 325-332. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.009>
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H. U., & Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ*, 16(7), 966-975. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.33>
- Eizirik, D. L., & Colli, M. L. (2020). Revisiting the role of inflammation in the loss of pancreatic β -cells in T1DM. *Nat Rev Endocrinol*, 16(11), 611-612. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00409-6>
- Eizirik, D. L., Szymczak, F., & Mallone, R. (2023). Why does the immune system destroy pancreatic β -cells but not α -cells in type 1 diabetes? *Nat Rev Endocrinol*, 19(7), 425-434. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00826-3>
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., & Klionsky, D. J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 24(1), 24-41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>
- Ferreira, R. C., Guo, H., Coulson, R. M., Smyth, D. J., Pekalski, M. L., Burren, O. S., Cutler, A. J., Doecke, J. D., Flint, S., McKinney, E. F., Lyons, P. A., Smith, K. G., Achenbach, P., Beyerlein, A., Dunger, D. B., Clayton, D. G., Wicker, L. S., Todd, J. A., Bonifacio, E., & Ziegler, A. G. (2014). A type I interferon transcriptional signature precedes autoimmunity in children genetically at risk for type 1 diabetes. *Diabetes*, 63(7), 2538-2550. <https://doi.org/10.2337/db13-1777>
- Fujitani, Y., Ueno, T., & Watada, H. (2010). Autophagy in health and disease. 4. The role of pancreatic beta-cell autophagy in health and diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299(1), C1-6. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00084.2010>
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221(1), 3-12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- Hamaguchi, K., & Leiter, E. H. (1990). Comparison of cytokine effects on mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines. Viability, secretory function, and MHC antigen expression. *Diabetes*, 39(4), 415-425. <https://doi.org/10.2337/diab.39.4.415>
- Hayes, H. L., Peterson, B. S., Haldeman, J. M., Newgard, C. B., Hohmeier, H. E., & Stephens, S. B. (2017). Delayed apoptosis allows islet beta-cells to implement an autophagic mechanism

- to promote cell survival. *PLoS One*, 12(2), e0172567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172567>
- Himuro, M., Miyatsuka, T., Suzuki, L., Miura, M., Katahira, T., Goto, H., Nishida, Y., Sasaki, S., Koike, M., Shiota, C., Gittes, G. K., Fujitani, Y., & Watada, H. (2019). Cellular Autophagy in alpha Cells Plays a Role in the Maintenance of Islet Architecture. *J Endocr Soc*, 3(11), 1979-1992. <https://doi.org/10.1210/js.2019-00075>
- Hubert, V., Weiss, S., Rees, A. J., & Kain, R. (2022). Modulating Chaperone-Mediated Autophagy and Its Clinical Applications in Cancer. *Cells*, 11(16). <https://doi.org/10.3390/cells11162562>
- Hultcrantz, M., Hühn, M. H., Wolf, M., Olsson, A., Jacobson, S., Williams, B. R., Korsgren, O., & Flodström-Tullberg, M. (2007). Interferons induce an antiviral state in human pancreatic islet cells. *Virology*, 367(1), 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.010>
- Ichimura, Y., Kominami, E., Tanaka, K., & Komatsu, M. (2008). Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy. *Autophagy*, 4(8), 1063-1066. <https://doi.org/10.4161/auto.6826>
- IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee. (2022). IDF DIABETES ATLAS. *International Diabetes Federation*. <https://www.diabetesatlas.org/>
- In't Veld, P., & Marichal, M. (2010). Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans. *Adv Exp Med Biol*, 654, 1-19. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3271-3_1
- Jean-Baptiste, V. S. E., Xia, C. Q., Clare-Salzler, M. J., & Horwitz, M. S. (2017). Type 1 Diabetes and Type 1 Interferonopathies: Localization of a Type 1 Common Thread of Virus Infection in the Pancreas. *EBioMedicine*, 22, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.06.014>
- Jun, H. S., & Yoon, J. W. (2003). A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 19(1), 8-31. <https://doi.org/10.1002/dmrr.337>
- Jung, H. S., Chung, K. W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y. H., Kang, T. M., Yoon, K. H., Kim, J. W., Jeong, Y. T., Han, M. S., Lee, M. K., Kim, K. W., Shin, J., & Lee, M. S. (2008). Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab*, 8(4), 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.013>
- Kallionpää, H., Elo, L. L., Laajala, E., Mykkänen, J., Riccaño-Ponce, I., Vaarma, M., Laajala, T. D., Hyöty, H., Ilonen, J., Veijola, R., Simell, T., Wijmenga, C., Knip, M., Lähdesmäki, H., Simell, O., & Lahesmaa, R. (2014). Innate immune activity is detected prior to seroconversion in children with HLA-conferred type 1 diabetes susceptibility. *Diabetes*, 63(7), 2402-2414. <https://doi.org/10.2337/db13-1775>
- Kaur, J., & Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(8), 461-472. <https://doi.org/10.1038/nrm4024>
- Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(6), 365-381. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13(2), 132-141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kim, K. A., & Lee, M. S. (2010). Role and mechanism of pancreatic beta-cell death in diabetes: The emerging role of autophagy. *J Diabetes Investig*, 1(6), 232-238. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00054.x>

- Kirchner, P., Bourdenx, M., Madrigal-Matute, J., Tiano, S., Diaz, A., Bartholdy, B. A., Will, B., & Cuervo, A. M. (2019). Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS Biol*, *17*(5), e3000301. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000301>
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., Adihetty, P. J., Adler, S. G., Agam, G., Agarwal, R., Aghi, M. K., Agnello, M., Agostinis, P., Aguilar, P. V., Aguirre-Ghiso, J., . . . Zughair, S. M. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, *12*(1), 1-222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>
- Krogvold, L., Edwin, B., Buanes, T., Frisk, G., Skog, O., Anagandula, M., Korsgren, O., Undlien, D., Eike, M. C., Richardson, S. J., Leete, P., Morgan, N. G., Oikarinen, S., Oikarinen, M., Laiho, J. E., Hyöty, H., Ludvigsson, J., Hanssen, K. F., & Dahl-Jørgensen, K. (2015). Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes. *Diabetes*, *64*(5), 1682-1687. <https://doi.org/10.2337/db14-1370>
- Lamark, T., & Johansen, T. (2021). Mechanisms of Selective Autophagy. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *37*, 143-169. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-035530>
- Lamark, T., Svenning, S., & Johansen, T. (2017). Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem*, *61*(6), 609-624. <https://doi.org/10.1042/EBC20170035>
- Lambelet, M., Terra, L. F., Fukaya, M., Meyerovich, K., Labriola, L., Cardozo, A. K., & Allagnat, F. (2018). Dysfunctional autophagy following exposure to pro-inflammatory cytokines contributes to pancreatic β -cell apoptosis. *Cell Death Dis*, *9*(2), 96. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0121-5>
- Las, G., Serada, S. B., Wikstrom, J. D., Twig, G., & Shirihai, O. S. (2011). Fatty acids suppress autophagic turnover in β -cells. *J Biol Chem*, *286*(49), 42534-42544. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242412>
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2017). Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(2), 201-205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619876114>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2019). Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*, *176*(1-2), 11-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.048>
- Liao, Z., Wang, B., Liu, W., Xu, Q., Hou, L., Song, J., Guo, Q., & Li, N. (2021). Dysfunction of chaperone-mediated autophagy in human diseases. *Mol Cell Biochem*, *476*(3), 1439-1454. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-04006-z>
- Lind, K., Richardson, S. J., Leete, P., Morgan, N. G., Korsgren, O., & Flodström-Tullberg, M. (2013). Induction of an antiviral state and attenuated coxsackievirus replication in type III interferon-treated primary human pancreatic islets. *J Virol*, *87*(13), 7646-7654. <https://doi.org/10.1128/jvi.03431-12>
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(9), 741-752. <https://doi.org/10.1038/nrm2239>
- Marroqui, L., Dos Santos, R. S., Fløyel, T., Grieco, F. A., Santin, I., Op de Beek, A., Marselli, L., Marchetti, P., Pociot, F., & Eizirik, D. L. (2015). TYK2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Apoptosis and the Innate Immune Response in Human Pancreatic β -Cells. *Diabetes*, *64*(11), 3808-3817. <https://doi.org/10.2337/db15-0362>
- Marroqui, L., Dos Santos, R. S., Op de Beek, A., Coomans de Brachène, A., Marselli, L., Marchetti, P., & Eizirik, D. L. (2017). Interferon- α mediates human beta cell HLA class I overexpression,

- endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. *Diabetologia*, 60(4), 656-667. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4201-3>
- Marroqui, L., Lopes, M., dos Santos, R. S., Grieco, F. A., Roivainen, M., Richardson, S. J., Morgan, N. G., Op de Beeck, A., & Eizirik, D. L. (2015). Differential cell autonomous responses determine the outcome of coxsackievirus infections in murine pancreatic α and β cells. *Elife*, 4, e06990. <https://doi.org/10.7554/eLife.06990>
- Marroqui, L., Perez-Serna, A. A., Babiloni-Chust, I., & Dos Santos, R. S. (2021). Type I interferons as key players in pancreatic β -cell dysfunction in type 1 diabetes. *Int Rev Cell Mol Biol*, 359, 1-80. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.02.011>
- Martínez, M. S., Manzano, A., Olivar, L. C., Nava, M., Salazar, J., D'Marco, L., Ortiz, R., Chacín, M., Guerrero-Wyss, M., Cabrera de Bravo, M., Cano, C., Bermúdez, V., & Angarita, L. (2021). The Role of the α Cell in the Pathogenesis of Diabetes: A World beyond the Mirror. *Int J Mol Sci*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179504>
- Masini, M., Bugliani, M., Lupi, R., del Guerra, S., Boggi, U., Filipponi, F., Marselli, L., Masiello, P., & Marchetti, P. (2009). Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 52(6), 1083-1086. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1347-2>
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K. J., Coppes, R. P., Engedal, N., Mari, M., & Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14(8), 1435-1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
- Mauvezin, C., & Neufeld, T. P. (2015). Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11(8), 1437-1438. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1066957>
- Melnyk, O., Muralidharan, C., Duffett, B. E., Novak, A. N., Perez-Aviles, G., Martinez, M. M., Crowder, J. J., & Linnemann, A. K. (2023). <https://doi.org/10.1101/2023.05.23.541935>
- Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., & Yamamura, K. (1990). Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology*, 127(1), 126-132. <https://doi.org/10.1210/endo-127-1-126>
- Muralidharan, C., Conteh, A. M., Marasco, M. R., Crowder, J. J., Kuipers, J., de Boer, P., & Linnemann, A. K. (2021). Pancreatic beta cell autophagy is impaired in type 1 diabetes. *Diabetologia*, 64(4), 865-877. <https://doi.org/10.1007/s00125-021-05387-6>
- Nakatogawa, H. (2020). Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21(8), 439-458. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0241-0>
- Nigi, L., Brusco, N., Grieco, G. E., Licata, G., Krogvold, L., Marselli, L., Gysemans, C., Overbergh, L., Marchetti, P., Mathieu, C., Dahl Jorgensen, K., Sebastiani, G., & Dotta, F. (2020). Pancreatic Alpha-Cells Contribute Together With Beta-Cells to CXCL10 Expression in Type 1 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 630. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00630>
- Nikoletopoulou, V., Papandreou, M. E., & Tavernarakis, N. (2015). Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ*, 22(3), 398-407. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.204>
- Padgett, L. E., Broniowska, K. A., Hansen, P. A., Corbett, J. A., & Tse, H. M. (2013). The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1281(1), 16-35. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06826.x>

- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, *20*(3), 460-473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
- Pasquier, B. (2016). Autophagy inhibitors. *Cell Mol Life Sci*, *73*(5), 985-1001. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2104-y>
- Pirot, P., Cardozo, A. K., & Eizirik, D. L. (2008). Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, *52*(2), 156-165. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302008000200003>
- Prasad, M. K., Mohandas, S., & Ramkumar, K. M. (2023). Dysfunctions, molecular mechanisms, and therapeutic strategies of pancreatic β -cells in diabetes. *Apoptosis*, *28*(7-8), 958-976. <https://doi.org/10.1007/s10495-023-01854-0>
- Quan, W., Hur, K. Y., Lim, Y., Oh, S. H., Lee, J. C., Kim, K. H., Kim, G. H., Kim, S. W., Kim, H. L., Lee, M. K., Kim, K. W., Kim, J., Komatsu, M., & Lee, M. S. (2012). Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice. *Diabetologia*, *55*(2), 392-403. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2350-y>
- Quan, W., Lim, Y. M., & Lee, M. S. (2012). Role of autophagy in diabetes and endoplasmic reticulum stress of pancreatic β -cells. *Exp Mol Med*, *44*(2), 81-88. <https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.2.030>
- Rajendran, S., Anquetil, F., Quesada-Masachs, E., Graef, M., Gonzalez, N., Mc Ardle, S., Chu, T., Krogvold, L., Dahl-Jørgensen, K., & von Herrath, M. (2020). IL-6 is present in beta and alpha cells in human pancreatic islets: Expression is reduced in subjects with type 1 diabetes. *Clin Immunol*, *211*, 108320. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2019.108320>
- Rashid, H. O., Yadav, R. K., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2015). ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, *11*(11), 1956-1977. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091141>
- Riahi, Y., Wikstrom, J. D., Bachar-Wikstrom, E., Polin, N., Zucker, H., Lee, M. S., Quan, W., Haataja, L., Liu, M., Arvan, P., Cerasi, E., & Leibowitz, G. (2016). Autophagy is a major regulator of beta cell insulin homeostasis. *Diabetologia*, *59*(7), 1480-1491. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3868-9>
- Richardson, S. J., Rodriguez-Calvo, T., Gerling, I. C., Mathews, C. E., Kaddis, J. S., Russell, M. A., Zeissler, M., Leete, P., Krogvold, L., Dahl-Jørgensen, K., von Herrath, M., Pugliese, A., Atkinson, M. A., & Morgan, N. G. (2016). Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes. *Diabetologia*, *59*(11), 2448-2458. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4067-4>
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*, *48*(3), e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>
- Rorsman, P., & Ashcroft, F. M. (2018). Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiol Rev*, *98*(1), 117-214. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017>
- Rorsman, P., & Braun, M. (2013). Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol*, *75*, 155-179. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>
- Santin, I., & Eizirik, D. L. (2013). Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and β -cell apoptosis. *Diabetes Obes Metab*, *15 Suppl 3*, 71-81. <https://doi.org/10.1111/dom.12162>
- Sarkar, S., Korolchuk, V., Renna, M., Winslow, A., & Rubinsztein, D. C. (2009). Methodological considerations for assessing autophagy modulators: a study with calcium phosphate precipitates. *Autophagy*, *5*(3), 307-313. <https://doi.org/10.4161/auto.5.3.7664>

- Schmeisser, H., Bekisz, J., & Zoon, K. C. (2014). New function of type I IFN: induction of autophagy. *J Interferon Cytokine Res*, 34(2), 71-78. <https://doi.org/10.1089/jir.2013.0128>
- Schmeisser, H., Fey, S. B., Horowitz, J., Fischer, E. R., Balinsky, C. A., Miyake, K., Bekisz, J., Snow, A. L., & Zoon, K. C. (2013). Type I interferons induce autophagy in certain human cancer cell lines. *Autophagy*, 9(5), 683-696. <https://doi.org/10.4161/auto.23921>
- Schroeder, W. T., Lopez, L. C., Harper, M. E., & Saunders, G. F. (1984). Localization of the human glucagon gene (GCG) to chromosome segment 2q36----37. *Cytogenet Cell Genet*, 38(1), 76-79. <https://doi.org/10.1159/000132034>
- Sheng, Q., Xiao, X., Prasad, K., Chen, C., Ming, Y., Fusco, J., Gangopadhyay, N. N., Ricks, D., & Gittes, G. K. (2017). Autophagy protects pancreatic beta cell mass and function in the setting of a high-fat and high-glucose diet. *Sci Rep*, 7(1), 16348. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16485-0>
- Stolz, A., Ernst, A., & Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol*, 16(6), 495-501. <https://doi.org/10.1038/ncb2979>
- Størling, J., & Pociot, F. (2017). Type 1 Diabetes Candidate Genes Linked to Pancreatic Islet Cell Inflammation and Beta-Cell Apoptosis. *Genes (Basel)*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/genes8020072>
- Streeter, A., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2016). LC3-II Tagging and Western Blotting for Monitoring Autophagic Activity in Mammalian Cells. *Methods Mol Biol*, 1303, 161-170. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2627-5_8
- Suckale, J., & Solimena, M. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci*, 13, 7156-7171. <https://doi.org/10.2741/3218>
- Tanemura, M., Ohmura, Y., Deguchi, T., Machida, T., Tsukamoto, R., Wada, H., Kobayashi, S., Marubashi, S., Eguchi, H., Ito, T., Nagano, H., Mori, M., & Doki, Y. (2012). Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo. *Am J Transplant*, 12(1), 102-114. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03771.x>
- Tekirdag, K., & Cuervo, A. M. (2018). Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *J Biol Chem*, 293(15), 5414-5424. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.818237>
- Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., & Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. *J Cell Biol*, 217(7), 2273-2289. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802095>
- Wu, Y. C., Wu, W. K., Li, Y., Yu, L., Li, Z. J., Wong, C. C., Li, H. T., Sung, J. J., & Cho, C. H. (2009). Inhibition of macroautophagy by bafilomycin A1 lowers proliferation and induces apoptosis in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 382(2), 451-456. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.051>
- Xie, Z., Xie, Y., Xu, Y., Zhou, H., Xu, W., & Dong, Q. (2014). Bafilomycin A1 inhibits autophagy and induces apoptosis in MG63 osteosarcoma cells. *Mol Med Rep*, 10(2), 1103-1107. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2281>
- Yasasilka, X. R., & Lee, M. S. (2024). Role of β -cell autophagy in β -cell physiology and the development of diabetes. *J Diabetes Investig*. <https://doi.org/10.1111/jdi.14184>
- Yin, J. J., Li, Y. B., Wang, Y., Liu, G. D., Wang, J., Zhu, X. O., & Pan, S. H. (2012). The role of autophagy in endoplasmic reticulum stress-induced pancreatic β cell death. *Autophagy*, 8(2), 158-164. <https://doi.org/10.4161/auto.8.2.18807>