



Evaluación del impacto de una mezcla de disruptores endocrinos sobre la viabilidad y funcionalidad de células β expuestas a un mimético de infecciones virales

Autor: Alejandro MontalvÀ Giménez

Tutor: Reinaldo Sousa dos Santos

Cotutora: Laura Marroquí Esclapez

Máster en Biotecnología y Bioingeniería

Facultad de Ciencias Experimentales

Islet Biology Lab

Trabajo final de máster

Curso 2024 – 2025

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

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

“Evaluación del impacto de una mezcla de disruptores endocrinos sobre la viabilidad y funcionalidad de células β expuestas a un mimético de infecciones virales”:

ALEJANDRO MONTALVÀ GIMÉNEZ

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 de septiembre de 2025

Fdo.: Dr.Reinaldo Sousa dos Santos, iDIBE, Universidad Miguel Hernández.

Fdo.: Prof. Laura Marroquí Esclapez, iDIBE, Universidad Miguel Hernández.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS | 2 |
| RESUMEN | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 4 |
| Páncreas endocrino. | 4 |
| Diabetes tipo 1: Problemática global. | 6 |
| Factores ambientales: Infecciones virales y disruptores endocrinos. | 11 |
| ANTECEDENTES Y OBJETIVOS | 18 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| Manejo y uso de células: EndoC-βH1, INS-1E y MIN6 | 19 |
| Tratamientos celulares | 21 |
| Viabilidad celular mediante tinciones de unión al ADN | 23 |
| Ensayo de producción de ERO intracelular con sonda DCF | 24 |
| Secreción de insulina estimulada por glucosa | 25 |
| Cuantificación de proteína total | 25 |
| Determinación de la expresión de ARN por PCR cuantitativa (qPCR) | 26 |
| Determinación de la expresión de proteínas por Western blot | 28 |
| Análisis estadístico | 29 |
| RESULTADOS | 29 |
| La exposición a la mezcla de disruptores endocrinos indujo la apoptosis en células β. | 29 |
| La mezcla de disruptores a concentraciones 1 nM y 1 μM no alteró la producción de ERO intracelular en células β. | 30 |
| La mezcla de disruptores endocrinos no cambió la expresión de las proteínas Bcl-xL y Bcl-2. | 31 |
| El tratamiento con PIC junto a la mezcla de disruptores endocrinos aumentó la apoptosis en células β. | 32 |
| El PIC aumentó la producción de ERO intracelular en las células INS-1E, pero no en las células EndoC-βH1 y MIN6. | 34 |
| El PIC, pero no la mezcla de disruptores endocrinos, disminuyó la expresión de Bcl-xL y Bcl-2 en las células INS-1E. | 35 |
| El PIC junto a la mezcla de disruptores endocrinos aumentó la expresión de <i>Bip</i> , <i>Chop</i> y <i>Xbp1s</i> . | 35 |
| El pretratamiento con la mezcla de disruptores endocrinos no potenció el efecto del PIC sobre la apoptosis en células β | 37 |
| Ni la mezcla de disruptores endocrinos ni el PIC alteraron la secreción de insulina inducida estimulada por glucosa | 38 |
| DISCUSIÓN | 39 |
| CONCLUSIONES | 46 |
| BIBLIOGRAFÍA | 47 |

ABREVIATURAS

ARNdc: ARN de doble cadena

Bip: Proteína de inmunoglobulina de unión

BPA: Bisfenol A

BSA: Seroalbúmina bovina

CAR: Receptor de coxsackievirus y adenovirus

Chop: Proteína homóloga a las proteínas de unión al potenciador CCAAT

CVB: Coxsackievirus B

DCF: Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

DDE: Diclorodifenildicloroetileno

Ddit3: Transcrito inducible por daño en el ADN 3

DDT: Diclorodifeniltricloroetileno

DEHP: Ftalato de di-2-etilhexilo

DT1: Diabetes tipo 1

DT2: Diabetes tipo 2

ERO: Especie reactiva de oxígeno

FBS: Suero bovino fetal

HLA-I: Sistema del antígeno leucocitario humano de clase I

HO: Hoechst 33342

HSPA5: Proteína de choque térmico familia A miembro 5

IFN: Interferon

IP: Ioduro de propidio

IRF: Factor regulador de interferon

MAVS: Adaptador de señalización antiviral mitocondrial

MDA5: Proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NOD: Ratones diabéticos no obesos

PFOA: Ácido perfluorooctanoico

PIC: Ácido poliinosínico-policitidílico

qPCR: PCR cuantitativa

RE: Retículo endoplasmático

RIG-I: Gen inducible por ácido retinoico I

STAT: Factores transductores de señales y activadores de transcripción

TCS: Triclosán

TLR: Receptor Toll-like

TRAF: Factor asociado al receptor de TNF

TRIF: Proteína adaptadora con dominio Toll-IL-1

UPR: Respuesta a proteínas desplegadas

Xbp1s: Proteína de unión X-box 1 escindida.

RESUMEN

La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción selectiva de las células β pancreáticas. Su incidencia ha aumentado de manera significativa en las últimas décadas, lo que sugiere un papel creciente de factores ambientales más allá de la predisposición genética. Entre ellos, las infecciones virales y la exposición a disruptores endocrinos han sido propuestos como desencadenantes relevantes. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de una mezcla de disruptores endocrinos sobre la viabilidad y función de las células β , así como su respuesta a un mimético sintético de infección viral (PIC). Para ello, se utilizaron tres líneas celulares de células β pancreáticas (EndoC- β H1, INS-1E y MIN6), expuestas a la mezcla y/o a PIC. Se analizaron la viabilidad celular, la apoptosis, la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la expresión de marcadores de estrés del retículo endoplasmático (RE) y de proteínas relacionadas con la apoptosis, además de la secreción de insulina estimulada por glucosa. La mezcla de disruptores indujo apoptosis sin alterar la producción de ERO ni la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-xL y Bcl-2. El PIC incrementó la apoptosis y la generación de ERO en células INS-1E, y redujo la expresión de Bcl-xL y Bcl-2. El tratamiento combinado con ambos potenció la apoptosis y aumentó la expresión de marcadores de estrés del RE (*BiP*, *Chop*, *Xbp1s*), aunque el pretratamiento con la mezcla no amplificó el efecto del PIC. Ni la mezcla ni el PIC modificaron de forma significativa la secreción de insulina estimulada por glucosa. En conclusión, la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de disruptores endocrinos compromete la supervivencia de las células β , especialmente bajo condiciones de estrés viral, a través de mecanismos asociados a la apoptosis y al estrés del retículo endoplasmático. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la exposición crónica a mezclas de disruptores podría contribuir a la vulnerabilidad de las células β y al desarrollo de DT1 en individuos con predisposición genética.

Palabras clave: Diabetes tipo 1, disruptores endocrinos, infecciones virales, células β pancreáticas.

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by the selective destruction of pancreatic β -cells. Its incidence has increased significantly in recent decades, suggesting a growing role of environmental factors beyond genetic predisposition. Among these, viral infections and exposure to endocrine disruptors have been proposed as relevant triggers. The aim of this study was to evaluate the impact of a mixture of endocrine disruptors on β -cell viability and function, as well as their response to a synthetic viral infection mimetic (PIC). To this end, three pancreatic β -cell lines (EndoC- β H1, INS-1E, and MIN6) were exposed to the mixture and/or PIC. Cell viability, apoptosis, reactive oxygen species (ROS) production, expression of endoplasmic reticulum (ER) stress markers and apoptosis-related proteins, and glucose-stimulated insulin secretion were assessed. The mixture of disruptors induced apoptosis without altering ROS production or the expression of the anti-apoptotic proteins Bcl-xL and Bcl-2. PIC increased apoptosis and ROS generation in INS-1E cells and reduced the expression of Bcl-xL and Bcl-2. Combined treatment with both enhanced apoptosis and upregulated the expression of ER stress markers (BiP, Chop, Xbp1s), although pretreatment with the mixture did not amplify the effect of PIC. Neither the mixture nor PIC significantly modified glucose-stimulated insulin secretion. In conclusion, exposure to environmentally relevant concentrations of endocrine disruptors compromises β -cell survival, particularly under viral stress conditions, through mechanisms involving apoptosis and ER stress. These findings support the hypothesis that chronic exposure to mixtures of disruptors may contribute to β -cell vulnerability and the development of T1D in genetically predisposed individuals.

Keywords: Type 1 diabetes, endocrine-disrupting chemicals, viral infections, pancreatic β -cells.

INTRODUCCIÓN

Páncreas endocrino.

El páncreas es un órgano en el que, tanto a nivel funcional como histológico, podemos diferenciar dos partes: una endocrina y otra exocrina. Por un lado, el páncreas exocrino se encarga de secretar moléculas para facilitar tanto la digestión de los alimentos como la absorción de nutrientes. Por otro lado, el páncreas endocrino se encarga de la secreción de hormonas necesarias para la homeostasis de la glucosa que actúan en otros órganos (Longnecker & Thompson, 2023). El páncreas endocrino está esencialmente formado por estructuras conocidas como islotes de Langerhans. Estos islotes son esféricos, se distribuyen de manera homogénea y constituyen entre el 1-4 % del total del páncreas (Dolenšek et al., 2015; Ionescu-Tirgoviste et al., 2015). Los islotes varían en composición celular dependiendo de la especie (Figura 1; Steiner et al., 2010) y esta se correlaciona con diferencias funcionales (Cabrera et al., 2006).

Los tipos celulares que podemos encontrar en los islotes son: células β , que en humanos corresponden aproximadamente al 60 % del total de células; células α , que conforman cerca del 30 % del total de células en humanos; y células δ , células PP o γ , y células ϵ , que en conjunto constituyen el 10 % restante (Figura 1; Noguchi & Huisling, 2019).

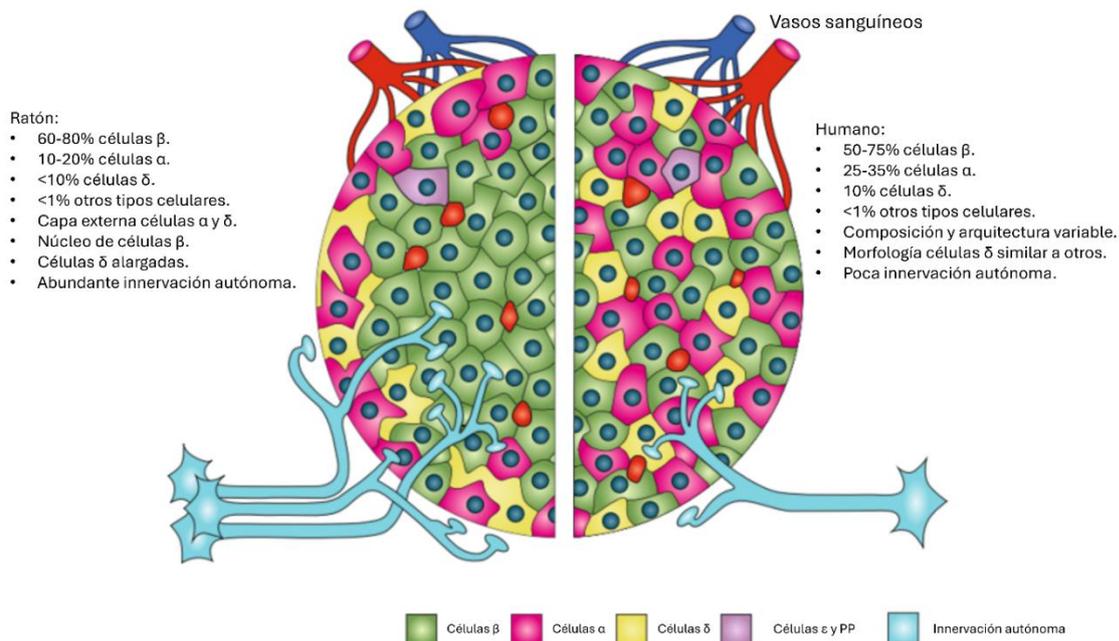


Figura 1. Comparación de la arquitectura de los islotes pancreáticos de humanos y ratones. Los islotes murinos presentan un núcleo de células β y una capa periférica de células α y δ . En los humanos, todos los tipos celulares se distribuyen de manera homogénea por el islote. Modificada de (Noguchi & Huisling, 2019).

Célula β : la productora de insulina.

La función principal de la célula β es sintetizar y secretar insulina, una hormona peptídica de 51 aminoácidos codificada en humanos por el gen *INS*. En primera instancia, el gen da lugar

a un péptido de 110 aminoácidos conocido como preproinsulina. Este péptido es transportado al retículo endoplasmático rugoso, dónde se escinde el péptido señal, una parte del inicio de la secuencia de entre 5 y 30 aminoácidos, dando lugar a la proinsulina. Posteriormente, la proinsulina se pliega formándose tres puentes disulfuro entre los dominios A y B de la proteína. A continuación, la proinsulina es transportada al aparato de Golgi y almacenada en vesículas donde sufrirá las últimas modificaciones: las proproteína convertasas 1, 2 y 3 escinden la parte de la secuencia central de la proinsulina generando el péptido C. Además, la carboxipeptidasa E escinde dos aminoácidos del extremo C-terminal dando lugar a la insulina activa, formada por dos péptidos, A y B, unidos por dos puentes disulfuro (Tokarz et al., 2018). La insulina se almacena en vesículas, formando hexámeros coordinados a dos iones de Zn^{2+} . Estas vesículas se transportan gracias a la red de microtúbulos celulares hasta la membrana plasmática, donde se mantendrán hasta que un estímulo provoque su liberación. Por lo general, este estímulo es un aumento de la glucosa en sangre (Rorsman & Ashcroft, 2018).

Según el modelo más aceptado de secreción de insulina inducida por glucosa, el proceso se inicia cuando la glucosa ingresa a la célula a través de los transportadores de glucosa GLUT1 y/o GLUT2. Una vez dentro, la glucosa se metaboliza mediante las rutas de la glucólisis, el Ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, lo que genera un aumento en la producción de ATP. Este incremento en la concentración intracelular de ATP eleva la relación ATP/ADP, provocando el cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP (canales K_{ATP}). Este cierre de los canales K_{ATP} causa la despolarización de la membrana plasmática, hecho que activa canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y permite un influjo de Ca^{2+} . El aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} induce la exocitosis de insulina (Figura 2; Frank et al., 2018; Tokarz et al., 2018).

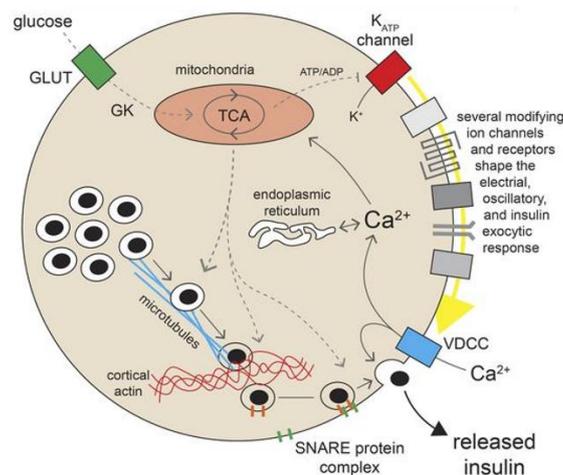


Figura 2. Proceso esquematizado de la liberación de insulina. El influjo de glucosa desencadena un aumento del ATP que provoca la despolarización de la membrana plasmática y, consiguientemente, la secreción de los gránulos de insulina almacenados en las vesículas. Imagen modificada de Tokarz et al., 2018. K_{ATP} channel: canal K_{ATP} .

Es importante matizar que esta no es la única forma de regular la liberación de insulina. Podemos destacar también vías de señalización en la que participan miembros como las proteínas quinasa A y C, el AMP cíclico, la fosfolipasa C, las quinasas reguladas por señales extracelulares o la β -arrestina (Frank et al., 2018). Además, se ha demostrado que todas las células β no se regulan igual, sino que hay células β centrales que pueden afectar al funcionamiento en el islote de otras células, incluso otras células β (Rutter & Hodson, 2013). Estas son capaces de producir una respuesta homogénea frente a los estímulos al sincronizar la secreción de insulina. Asimismo, al alterar el funcionamiento de estas células β centrales se produce una desfuncionalización del resto de células β (Johnston et al., 2016).

Otros tipos celulares pancreáticos.

Como se ha mencionado anteriormente, además de la célula β , los islotes están compuestos por más tipos celulares que pueden influir en la liberación de insulina mediante la señalización paracrina. De entre estos otros tipos celulares el que más destaca es la célula α . La principal función de estas células es la síntesis y secreción de glucagón en respuesta a bajas concentraciones de glucosa en sangre. Las células δ se encargan principalmente de secretar somatostatina, la cual regula la actividad de las células α y β al inhibir la liberación tanto de glucagón como de insulina (Rorsman & Huising, 2018). Por su parte, las células PP o γ producen polipéptido pancreático, que actúa regulando la motilidad intestinal y la secreción exocrina del páncreas (Batterham et al., 2003). Por último, encontramos las células ϵ que son productoras de grelina, una hormona implicada en la regulación del apetito y del metabolismo energético (Dominguez Gutierrez et al., 2018).

Diabetes tipo 1: Problemática global.

Se considera que una persona padece diabetes cuando presenta una elevación anormal y sostenida de los niveles de glucosa en sangre, sin capacidad de restablecer niveles adecuados sin intervención externa. Esta alteración suele deberse a una producción insuficiente de insulina para mantener la homeostasis glucémica, normalmente asociada a la disfunción y/o la pérdida de células β , o a una resistencia periférica a la acción de la insulina. Existen varios tipos de diabetes, siendo los más frecuentes la diabetes tipo 1 (DT1) y la diabetes tipo 2 (DT2). En el contexto de la DT2, a la cual corresponden el 90-95 % de los casos totales, existe una disminución de la respuesta a la insulina por parte de los tejidos periféricos, lo que genera una sobrecarga metabólica en las células β capaz de inducir su disfunción y apoptosis. En la DT1, a la que corresponden alrededor del 5-10 % de los casos, la pérdida de masa de células β funcionales se debe a un ataque autoinmune. La destrucción progresiva de las células β contribuye al desarrollo de complicaciones en la salud de las

personas con diabetes (DiMeglio et al., 2018). El presente trabajo final de máster se centrará en la DT1, profundizando en su etiología y sus mecanismos fisiopatológicos.

Se estima que en todo el mundo hay alrededor de los 9,5 millones de personas que padecen DT1, de los cuales 1,85 millones son menores de 20 años. Estos 9,5 millones representan entre el 5-10 % del total de personas con DT1 en el mundo. En España viven cerca de 200.000 personas con DT1, de las cuales 19.000 tienen menos de 20 años (International Diabetes Federation, 2025). Tanto la prevalencia como la incidencia de la DT1 han aumentado alarmantemente en las últimas décadas y se prevé que para 2040 afecte a cerca de 15 millones de personas a nivel global (Ogle et al., 2025).

Desarrollo de la enfermedad.

La DT1 es una enfermedad crónica autoinmune caracterizada por la destrucción de las células β mediada por las células T $CD4^+$ y $CD8^+$. Esta enfermedad tiene un componente genético importante, tal y como prueban estudios llevados a cabo en familias y gemelos: sobre un 15 % de los nuevos debuts tiene un familiar de primer grado que padece DT1. En hermanos y gemelos no idénticos el riesgo de que el otro hermano acabe desarrollando la enfermedad oscila entre el 3-13 %, mientras que en gemelos idénticos aumenta hasta valores próximos al 50 % (Pociot, 2017; Redondo et al., 2023). La DT1 es una enfermedad multifactorial, un rasgo característico de estas es poseer una herencia no mendeliana. Están involucrados múltiples genes con influencias reducidas que reciben el nombre de genes candidatos. Estudios de asociación de genoma completo (GWAS) han permitido la identificación de regiones genómicas con polimorfismos de nucleótido simple relacionados con el riesgo a padecer la DT1 que ayudan a explicar cerca del 80 % de la heredabilidad de la enfermedad (Pociot, 2017). Se han encontrado variantes en *loci* HLA, responsables del 50 % de la predisposición genética, y alrededor de 90 variantes en *loci* no-HLA, que aportan un riesgo bajo a moderado de padecer DT1 (Redondo et al., 2023).

A pesar de tener gran importancia, la genética no es el único factor que influye en el desarrollo de la DT1. Se ha propuesto que este aumento de la incidencia, comentado anteriormente, pueda estar influido por el estilo de vida del individuo, así como por alteraciones en los factores ambientales que le envuelven (Ilonen et al., 2019; Rewers & Ludvigsson, 2016). Respecto a esto, Ilonen y colaboradores proponen que el aumento en la incidencia entre niños de poblaciones estables genéticamente es una prueba de la importancia de los factores ambientales en la DT1 y cómo estos influyen en su desarrollo. Este significativo aumento comenzó en muchos países a mediados del siglo XX y durante los primeros años del siglo XXI empezó a estabilizarse (Ilonen et al., 2019).

Una de las principales hipótesis respecto al desarrollo de la DT1 fue planteada por Foulis y colaboradores en 1987 (Foulis et al., 1987). A pesar de tener casi 40 años, esta hipótesis se

mantiene vigente gracias a las evidencias empíricas que aporta, así como a las que la han ido reforzando hasta la actualidad (Richardson et al., 2014; Rodriguez-Calvo et al., 2025). La hipótesis propone que, en individuos predispuestos genéticamente, una infección producida por enterovirus en las etapas iniciales de la vida puede conducir a una infección leve, pero persistente en el tiempo, en un número reducido de células pancreáticas. Esta infección podría iniciar una respuesta inmune dirigida hacia las células β , aumentando la producción y secreción de quimiocinas e interferones (IFNs) de tipo I. Las quimiocinas, como por ejemplo CCL2, CCL5 y CXCL10, ejercen un papel de quimioatrayentes, dirigiendo a las células del sistema inmune a las inmediaciones del islote (Toren et al., 2021). Simultáneamente, los IFNs de tipo I provocarían una amplificación tanto de su propia producción como de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase I en los islotes. Esta serie de acontecimientos resulta en un estado conocido como insulinitis, que consiste en la infiltración de células del sistema inmune, como monocitos, macrófagos y linfocitos, en los islotes, provocando su inflamación y degeneración progresiva. Después de un tiempo de pérdida progresiva e irreversible de masa de células β funcionales, el paciente debuta con DT1 cuando se ha reducido cerca de un 80 % de dicha masa (Akirav et al., 2008; Marroqui, Perez-Serna, et al., 2021; Richardson et al., 2014) (Figura 3).

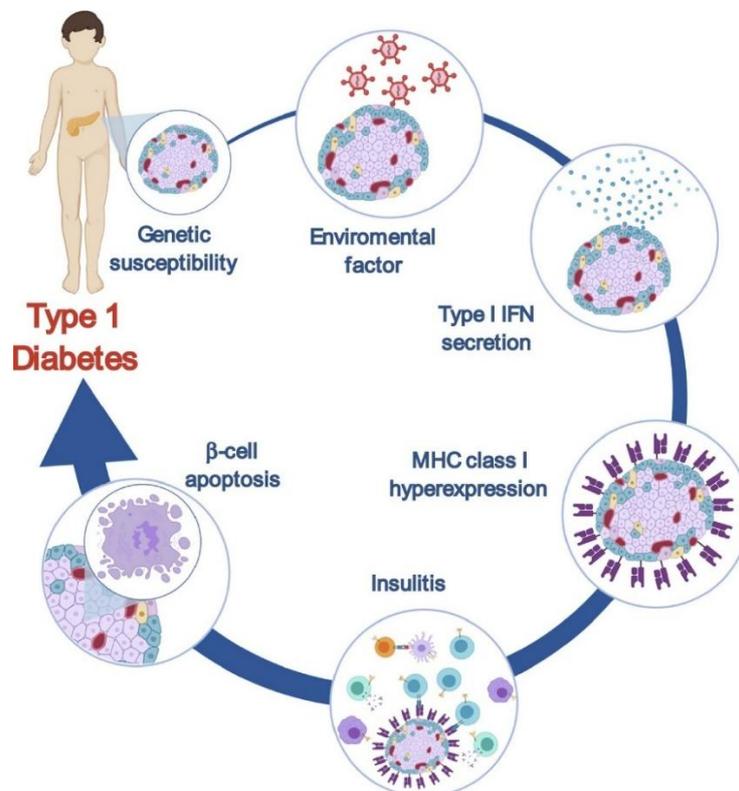


Figura 3. Secuencia de eventos propuesta para el desarrollo de la DT1. En individuos con predispuestos genéticamente, una infección por enterovirus en edad temprana podría inducir una infección leve, pero persistente en las células β . Esto provoca un aumento de la producción y secreción de IFNs de tipo I que activa mecanismos de autodefensa en las células próximas, como amplificar la producción de IFNs y la expresión del MHC de clase I. La producción de quimiocinas atrae a las células

del sistema inmune al islote. Este hecho acabará dando lugar a insulinitis y apoptosis de las células β . Finalmente, se produce el debut en DT1. Figura tomada de Marroqui et al., 2021.

Apoptosis de células β : Estrés oxidativo, estrés de retículo endoplasmático y proteínas de la familia Bcl-2

Es sabido que la inflamación característica de la DT1 contribuye con la pérdida de función y la apoptosis de las células β mediante un aumento en el estrés de retículo endoplasmático (RE) y en el estrés oxidativo (Brozzi & Eizirik, 2016; Eguchi et al., 2021; Sahin et al., 2021; Supale et al., 2012). Por tanto, no se puede entender la apoptosis de células β sin tener en cuenta estos factores.

La mitocondria es una fuente importante de especies reactivas de oxígeno (ERO), concretamente los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial producen superóxido (O_2^-) en la matriz mitocondrial y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el espacio intermembrana (Brand, 2016). Las ERO en condiciones fisiológicas son necesarias para la secreción de insulina estimulada por glucosa junto a un influjo de Ca^{2+} para facilitar la liberación de insulina. Sin embargo, la acumulación excesiva crónica de ERO desencadena daños en las células β . Adicionalmente, las células β son muy vulnerables al estrés oxidativo debido a su elevada actividad metabólica y su baja expresión de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasas, catalasas y glutatión peroxidasas) (Eguchi et al., 2021; Escribano-Lopez et al., 2019). Leenders y colaboradores encontraron una reducción de la secreción entre el 30-45 % al exponer células EndoC- β H1 a 50-200 μ M H_2O_2 . También detectaron menor expresión de genes específicos de célula β como *MAFA*, *PDX1*, *PAX6* y *GLUT1* en islotes y células EndoC- β H1 tras la exposición a 200 μ M H_2O_2 (Leenders et al., 2021).

Otro estrés para tener en cuenta en la apoptosis de las células β es el de RE. El RE está preparado para el plegar y procesar gran cantidad de proteínas, cosa que no evita que trabaje de manera óptima y, de vez en cuando, produzca proteínas mal plegadas. Afrentas ambientales, como las infecciones virales, así como el aumento interno en la demanda de síntesis proteica (por ejemplo, el aumento de producción de insulina en condiciones hiperglucémicas) provocan estrés de RE y aumentan la cantidad de proteínas mal plegadas (Sahin et al., 2021). La respuesta a proteínas desplegadas canónica (UPR, siglas del inglés *unfolded protein response*) está conformada por tres proteínas transmembrana del RE, ATF6, IRE1 α y PERK, que, en ausencia de estrés son estables gracias a su unión a BiP, una chaperona represora de la UPR localizada en el lumen del RE. Dependiendo de la gravedad y duración del estrés, la UPR desencadenará respuestas diferentes: bajo un estrés corto/suave se favorece la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la síntesis y/o plegamiento proteico para retomar las funciones habituales cuanto antes; en cambio, antes un estrés continuado y severo, como en el caso de la DT1, se desencadenan señales

apoptóticas (Hetz et al., 2020; Sahin et al., 2021). Ante una acumulación de proteínas mal plegadas, PERK se disocia de BiP, dimeriza y se autofosforila activando así su dominio quinasa. A continuación, fosforila eIF2 α e inhibe su actividad, deteniendo la traducción general y disminuyendo la síntesis y plegado proteico (Marciniak et al., 2006). Contrariamente, aumenta la traducción de ATF4, que induce la expresión de la subunidad fosfatasa de eIF2 α , favoreciendo así de nuevo la traducción. Ante un estrés crónico, ATF4 induce la expresión de CHOP, un factor de transcripción proapoptótico (Marciniak et al., 2004). Por otro lado, IRE1 α , al disociarse de BiP, autofosforila sus dominios quinasa, provocando un cambio conformacional y activando sus dominios plasmáticos enzimáticos (Ali et al., 2011). Un dominio ARNasa de IRE1 α provoca la escisión de un intrón de XBP1 dando lugar a la traducción de XBP1s, que regula la respuesta a estrés favoreciendo la expresión de chaperonas del RE (Yoshida et al., 2001). ATF6, por su parte, al disociarse de BiP es translocado al aparato de Golgi, donde será escindido y se liberará su dominio N terminal. Este dominio activará la transcripción en el núcleo de genes como *Xbp1*, *Chop* y chaperonas del RE (Yoshida et al., 2001).

Un elemento importante en la disfunción mitocondrial y la apoptosis son las proteínas de la familia de Bcl-2, pues son reguladores del ciclo celular y la supervivencia de las células. Esta familia contiene miembros tanto proapoptóticos como antiapoptóticos y, dependiendo de los dominios de homología de Bcl-2 (BH) que presenten en su estructura y función, pueden dividirse en: antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Bcl-B, Bfl-1, y Mcl-1L, todas con dominios BH1-4 muy conservados; proapoptóticas con los dominios BH1-4 también conservados como Bax, Bak, Bok, y Bcl-xS; y proapoptóticas con un único dominio BH3, conocidas como proteínas BH3-only, que pueden dividirse en sensibilizadoras (Bad, Bik, Bmf, Bnip3, Hrk/DP5, Beclin-1, y Noxa) y activadoras (Bim, tBid, Mule, y Puma) (Perez-Serna et al., 2025; Warren et al., 2019). Bcl-2 se encuentra en la membrana mitocondrial externa, en la membrana nuclear externa, el núcleo y el RE (Popgeorgiev et al., 2018); de manera similar, Bcl-xL se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial externa, también en la interna, el citosol o unida al RE (Eno et al., 2012). Las interacciones entre estas interacciones juegan un papel crucial en la apoptosis mediada por las mitocondrias (vía intrínseca) (Gurzov & Eizirik, 2011; Warren et al., 2019). Esta vía se desencadena cuando, fruto de algún estímulo, se activan los miembros BH3-only activadores provocando que los efectores proapoptóticos Bax y Bak oligomericen, formen poros en la membrana mitocondrial externa y puedan permeabilizarla. Esto provoca la liberación de factores proapoptóticos como el citocromo c, que favorece la activación de la caspasa 9 y esta, a su vez, activa caspasas efectoras como la 3 y la 7 (Czabotar et al., 2014).

Factores ambientales: Infecciones virales y disruptores endocrinos.

Se ha comentado anteriormente la hipótesis propuesta por Ilonen y colaboradores del papel que pueden jugar los factores ambientales en el desarrollo de la DT1 (Ilonen et al., 2019). Estos factores podrían ayudar a comprender la respuesta autoinmune en los islotes y cómo progresa hasta el momento del debut con la enfermedad.

El desarrollo de la DT1 se ha relacionado con diversos aspectos ambientales como pueden ser factores dietéticos, diferencias en el microbioma intestinal, la exposición a sustancias químicas tóxicas (como los disruptores endocrinos) o las infecciones virales, siendo estas últimas las respaldadas por evidencias más sólidas. Todos estos, aunque no de manera exclusiva, pueden afectar a los niños durante el periodo perinatal o en las primeras etapas de la infancia, influyendo mayoritariamente en individuos con predisposición genética (Rewers & Ludvigsson, 2016). La intención del presente trabajo es poner el foco en dos factores ambientales específicos: las infecciones virales y la exposición a los disruptores endocrinos.

Infecciones virales

Virus como los citomegalovirus, el virus Epstein-Barr, el de la rubéola y, en especial, los enterovirus han sido propuestos como posibles desencadenantes de la DT1. Siendo estos últimos quienes presentan evidencias más robustas de su relación con el desarrollo de DT1, particularmente los coxsackievirus B (CVB) (Isaacs et al., 2021). Los CVB pertenecen a la familia Picornaviridae, género *Enterovirus*, junto a los echovirus y poliovirus, y se clasifican en seis serotipos (CVB1-6) (Marjomäki & Flodström-Tullberg, 2022). Generalmente, los CVB suelen provocar infecciones leves, como la enfermedad de manos, pies y boca, aunque en raras ocasiones pueden provocar enfermedades graves como meningitis y miocarditis en recién nacidos (Carré et al., 2023).

Los enterovirus son virus sin envuelta externa, de aproximadamente 30 nm y con genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva. Los viriones están formados por 60 subunidades y cada una de ellas, a su vez, está constituida por 4 proteínas estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4. Esta última se sitúa en el interior del virión, mientras que VP1-3 forman la superficie de la cápside icosaédrica que encapsula el genoma viral (Baggen et al., 2018). Su ciclo vital empieza con la unión a los receptores en la superficie del huésped: los CVB necesitan del receptor de coxsackievirus y adenovirus para su infección de las células β (Lloyd et al., 2022). Los viriones son internalizados mediante endocitosis y, para la liberación del genoma viral en el citoplasma, inducen la formación de canales permeables a iones, proceso en el que VP4 es clave (Panjwani et al., 2014). Una vez liberado al citosol, el ARN es traducido y se produce una única poliproteína que será procesada en proteínas de replicación y proteínas de la cápside. La replicación se produce en estructuras membranosas inducidas por el virus que reciben el nombre de orgánulos de replicación y sirven para proteger al ARN viral frente a las

defensas celulares (van der Schaar et al., 2016). En estos, una ARN polimerasa dependiente de ARN viral sintetiza una copia de cadena negativa del ARN que servirá como molde para la síntesis de nuevas cadenas positivas, formándose en el proceso un intermediario de ARNdc. En un reciente artículo de revisión, Carré y colaboradores expusieron cuatro características fundamentales que respaldan que las infecciones por CVB serían desencadenantes de la DT1: En primer lugar, son infecciones frecuentes en la primera infancia, periodo coincidente con la aparición de los primeros autoanticuerpos en niños que acaban desarrollando la enfermedad. En segundo lugar, los CVB son muy comunes, pues más del 95 % de la población es seropositiva al menos para una de las seis cepas. En tercer lugar, a pesar de que pueden transmitirse por vía respiratoria, la principal vía de contagio es la fecal-oral. Finalmente, los CVB muestran elevada afinidad por las células β pancreáticas, hecho que puede ser causa de su mal funcionamiento y eventual muerte (Carré et al., 2023).

Las evidencias que vinculan la DT1 con infecciones por CVB se basan, mayoritariamente, en correlaciones observadas en estudios histopatológicos y de cohortes prospectivas (Isaacs et al., 2023; Wang et al., 2021). Se ha encontrado una relación entre la presencia de ARN o proteínas de la cápside viral (como VP1) en muestras de sangre, heces y tejido pancreático, y el comienzo de la autoinmunidad frente a los islotes y la manifestación clínica de la DT1 (Rodríguez-Calvo et al., 2025; Sioofy-Khojine et al., 2022; Vehik et al., 2019).

Varios estudios concluyen que el riesgo de seroconversión de autoanticuerpos no se asocia a infecciones frecuentes e independientes, sino más bien a una presencia viral prolongada en el tiempo, descartando la posibilidad de que la pérdida de células β se deba a una lisis mediada por virus (Nekoua et al., 2022; Vehik et al., 2019). Algunos estudios de colocalización de la proteína VP1 en islotes mediante inmunohistoquímica revelaron su presencia en muestras de donantes humanos, junto a dos marcadores de insulinitis y DT1 en fases tempranas: la sobreexpresión de MHC de clase I y la infiltración de células T. Se observó, además, que solo una pequeña porción de los islotes con células β eran positivos para VP1 (Carré et al., 2023; Krogvold et al., 2014). Además, el análisis de biopsias ha encontrado ARNm y ARNdc en tejido pancreático y cardíaco de pacientes con infecciones por CVB. Estos ácidos nucleicos también se han encontrado en muestras fecales de pacientes con DT1 (Nekoua et al., 2022).

Las recientes publicaciones del nPOD-Virus Group representan el análisis más extenso y coordinado hasta la fecha sobre marcadores de riesgo de autoanticuerpos, así como de la presencia de enterovirus en el páncreas y tejidos linfoides de donantes de órganos con DT1 (Laiho et al., 2025; Richardson et al., 2025; Rodríguez-Calvo et al., 2025). Encontraron un mayor rastro de infecciones por enterovirus (proteínas VP1, péptidos y ARN virales) en donantes positivos para autoanticuerpos y donantes con DT1 que aún conservaban células β capaces de producir insulina, en comparación con donantes sin diabetes. Es destacable la

asociación entre el marcaje positivo para VP1 y la hiperexpresión de HLA de clase I (HLA-I) en células de los islotes, pues un 74 % de los donantes testados para VP1 y HLA-I presentaron resultados positivos para ambos (Rodríguez-Calvo et al., 2025). La hiperexpresión de HLA-I no se observó en donantes sin diabetes, incluso entre los que presentaban células β con marcaje positivo para VP1 (Richardson et al., 2025). Adicionalmente, se observó que las células β son objetivos preferenciales en las infecciones enterovirales del páncreas. Esto se debe a que las células β presentan elevada expresión del receptor CAR, empleado por los CVB, y una respuesta antiviral innata débil (Laiho et al., 2025). En su conjunto, estos tres artículos refuerzan la asociación entre enterovirus y la patogénesis de la DT1, sugiriendo que una infección de bajo grado persistente, probablemente recurrente, pueda contribuir a la autoinmunidad de los islotes y la pérdida de células β .

Estudios previos en diferentes modelos *in vitro* (líneas celulares y células β derivadas de células pluripotenciales inducidas humanas) y *ex vivo* (células primarias de roedores e islotes humanos) muestran que diversas variantes de CVB, como los CVB1, 3, 4 y 5, inducen cambios en la función, morfología y supervivencia de las células β . Respecto al efecto de las infecciones por CVBs en la función de las células β , se ha observado una reducción en la expresión de genes de identidad de célula β (como *INS*, *MAFA* y *PDX1*), afectando también a la producción de insulina y su secreción estimulada por glucosa (Hodik et al., 2016; Nyalwidhe et al., 2020). Adicionalmente, un hallazgo documentado habitualmente en las infecciones por CVBs en células β es la inducción de la muerte celular (Dos Santos et al., 2019; Roivainen et al., 2000; Vecchio et al., 2024). Estos resultados pueden, parcialmente, explicarse mediante estudios ómicos, pues ha sido demostrado que la infección por CVB es capaz de alterar la expresión de genes partícipes de vías clave relacionadas con la inflamación y respuesta inmunitaria innata (vías de IFNs de tipo I y NF- κ B, por ejemplo), la respuesta al estrés (la autofagia y respuesta a proteínas mal plegadas) y el metabolismo energético (por ejemplo, la glucólisis y la fosforilación oxidativa) (Nyalwidhe et al., 2020; Veronese-Paniagua et al., 2024; Ylipaasto et al., 2012).

La infección por CVB5 induce un estrés parcial de RE en la línea de células β de rata INS-1E, ocurriendo lo mismo con la infección por CVB1, CVB4 y CVB5 en la línea de células de humanos EndoC- β H1: los CVB adaptan la UPR en las células β para favorecer su propia replicación. Al bloquear la vía proapoptótica PERK/ATF4/CHOP se aseguran de que las células infectadas no desencadenen la muerte de las células infectadas y, al aumentar la de IRE1 α provocando un aumento de la expresión de XBP1s y JNK, favorecen su replicación ya que JNK es clave para la amplificación de los CVB en las células β de ratas y humanos (Colli et al., 2019). En otro estudio se comprobó que la infección por CVB3 indujo disfunción mitocondrial y provocó un aumento de los niveles de ERO en islotes humanos (Veronese-

Paniagua et al., 2024). Los estudios funcionales, de manera unificada, sugieren que los CVBs serían capaces de desencadenar la autoinmunidad de los islotes de diferentes formas, no excluyentes entre sí, como son: el desencadenar la autoinmunidad específica de las células β , la destrucción directa de las propias células β y la activación secundaria de células T (Carré et al., 2023; Nekoua et al., 2022; Op de Beeck & Eizirik, 2016).

Una estrategia para estudiar *in vitro* los efectos de estas infecciones virales es utilizar ácido poliinosínico-policitidílico (PIC, por sus siglas en inglés), un análogo sintético del ARNdc empleado para simular las moléculas de este ácido nucleicos generadas durante la infección por ciertos virus, como los CVB. El PIC es reconocido por receptores de reconocimiento de patrones, como el receptor tipo Toll 3 (TLR3, por sus siglas en inglés), y las proteínas del gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I, por sus siglas en inglés) y del gen 5 asociado a la diferenciación del melanoma (MDA5, por sus siglas en inglés) (Jensen & Thomsen, 2012). Tras el reconocimiento del PIC, el TLR3 (aunque no exclusivamente) induce el reclutamiento del adaptador que contiene el dominio del receptor Toll/IL-1 que induce IFN β (TRIF, por sus siglas en inglés). Una vez reclutado TRIF interactúa con el factor 3 asociado al receptor de TNF (TRAF3) y ambos activan proteínas quinasas como TBK1, IKK ϵ e IKK α/β , que estimulan la expresión de IFN de tipo I mediante la activación de los factores de transcripción factor regulador del interferón (IRF) 3 e 7 (Alexopoulou et al., 2001) (Figura 4). Además, el reconocimiento del PIC por el TLR3 puede inducir la señalización a través de proteína TRAF6, lo que activa los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B, promoviendo la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β (Kawai & Akira, 2008; Tan et al., 2018) (Figura 4).

De manera complementaria, el PIC puede ser reconocido en el citoplasma por las helicasas de ARN RIG-1 y MDA5 (Kato et al., 2006) (Figura 4). Gracias a sus dominios CARD, MDA5 y RIG-1 interactúan con el adaptador de señalización antiviral mitocondrial (MAVS, por sus siglas en inglés) que se encuentra anclado a la membrana externa mitocondrial (Loo & Gale, 2011). Esta interacción promueve la oligomerización MAVS, un paso crucial para el reclutamiento de varias proteínas adaptadoras, como TRAFs, TBK1, IKK ϵ , IKK α/β . A partir de aquí, se establecen dos ramas principales de señalización: En la primera, TBK1 e IKK ϵ fosforilan IRF3/IRF7, que se dimerizan y translocan al núcleo, donde inducen la expresión de IFNs de tipo I y genes estimulados por IFNs. En la segunda, el complejo IKK α/β fosforila I κ B, promoviendo su degradación y permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo, donde se activan genes de citocinas como TNF- α e IL-1 β (Refolo et al., 2020) (Figura 4).

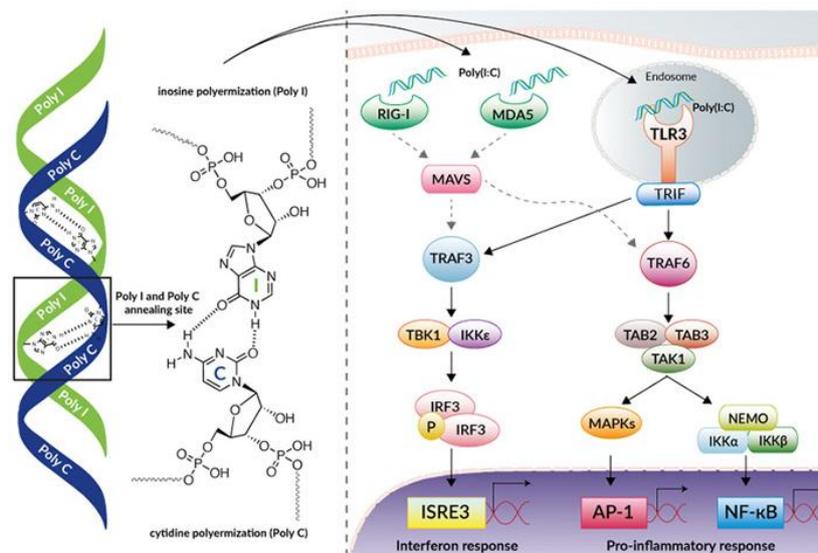


Figura 4. Estructura del ácido poliinosínico-policitidílico y vías de señalización que activa. El PIC es reconocido por TLR3, RIG-I y MDA5. TLR3 activa TRIF, que recluta TRAF3 y quinasas (TBK1, IKKε, IKKα/β), promoviendo la activación de IRF3/7 y la producción de IFN tipo I, así como la vía TRAF6 que induce NF-κB y AP-1, estimulando citocinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β). En el citoplasma, RIG-I y MDA5 interactúan con MAVS, cuya oligomerización recluta adaptadores y quinasas, convergiendo en dos rutas: activación de IRF3/7 para IFN tipo I e IKKα/β–NF-κB para citocinas proinflamatorias. Imagen tomada de InvivoGen, 2016.

Se ha demostrado que el PIC aumenta la apoptosis de células β en distintos modelos y especies, tanto en líneas celulares como en células β obtenidas a partir de islotes dispersados (Baden et al., 2015; Dogusan et al., 2008; Dos Santos et al., 2019; Marroqui et al., 2015; Oshima et al., 2018). El PIC también aumentó la expresión y la secreción de quimiocinas proinflamatorias al favorecer la producción de IFNs de tipo I que, a su vez, contribuyen a continuar con el proceso inflamatorio y la apoptosis (Dos Santos et al., 2019; Marroqui et al., 2015). En otro estudio, Colli y colaboradores demostraron que el tratamiento de células INS-1E con PIC intracelular causó una regulación negativa de la proteína Mcl-1, miembro antiapoptótico de la familia de Bcl-2, dando lugar a una liberación de Bim que, como consecuencia, activa la vía mitocondrial de la apoptosis (Colli et al., 2011). Finalmente, el PIC intracelular activó una clara respuesta de estrés del retículo endoplasmático en células β, evidenciada por la fosforilación sostenida de eIF2α, la reducción de la síntesis proteica y la inducción de la expresión de *Atf4*, *Chop*, *Bip* y *Xbp1s* (Dogusan et al., 2008).

Con respecto a sus efectos sobre la función de las células β, se ha demostrado que la exposición a PIC potencia la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes humanos (Hodik et al., 2016). En contraste, en islotes pancreáticos de ratón, el tratamiento con PIC intracelular mostró una tendencia a reducir la secreción de insulina inducida por glucosa y forskolina, aunque sin alcanzar significación estadística (Dogusan et al., 2008). Adicionalmente, en islotes murinos el PIC necesita de la presencia de IFNγ para disminuir la secreción de insulina estimulada por glucosa y aumentar la apoptosis (Scarim et al., 2001).

Disruptores endocrinos

Otro posible desencadenante ambiental para la DT1 es la exposición a contaminantes ambientales (Howard, 2019). Una clase de contaminantes particularmente relevante está constituida por los disruptores endocrinos, definidos como “una sustancia química exógena, o una mezcla de sustancias químicas, que interfiere con cualquier aspecto de la acción hormonal” (Gore et al., 2015). Estos compuestos pueden formarse en los organismos de manera natural o ser producidos industrialmente. Entre las producidas de manera natural encontramos metales pesados y sustancias derivadas de plantas, hongos y bacterias como cianotoxinas y fitoestrógenos (Virtuoso et al., 2024). Las sintéticas están presentes en productos agrícolas (pesticidas organoclorados, herbicidas y fungicidas), industriales (pinturas o plastificantes) y productos de uso cotidiano como cosméticos, textiles, envases de comida e incluso juguetes infantiles, ejemplos comunes de compuestos sintéticos son los bisfenoles, ftalatos o sustancias per y polifluoroalquiladas (Heindel et al., 2017).

Hace unos años se estableció un consenso con las características fundamentales que pueden presentar los compuestos químicos para ser considerados disruptores endocrinos. Estas establecen que los disruptores endocrinos: 1) Activan, antagonizan o interaccionan con receptores hormonales; 2) Alteran la expresión de receptores hormonales; 3) Alteran la transducción de señales en células que responden a hormonas; 4) Inducen modificaciones epigenéticas en células productoras o que responden a hormonas; 5) Alteran la síntesis, el transporte, la distribución, los niveles circulantes de hormonas o su metabolismo; 6) Alteran el destino de células productoras o que responden a hormonas (La Merrill et al., 2020).

La creciente evidencia proveniente de estudios celulares, en modelos animales e investigaciones epidemiológicas indica una asociación entre la exposición a disruptores endocrinos y un mayor riesgo de desarrollar diversas enfermedades metabólicas (Heindel et al., 2017; Papalou et al., 2019). No obstante, la investigación que examina específicamente la relación entre la exposición a estos contaminantes ambientales y la DT1 sigue siendo limitada. La mayoría de los estudios se han realizado en diferentes modelos animales de DT1, como ratones diabéticos no obesos (NOD) o con diabetes autoinmune inducida por múltiples dosis bajas de estreptozotocina, sugiriendo que los disruptores endocrinos podrían contribuir al inicio de la DT1 porque son capaces de afectar las respuestas inmunitarias del organismo (Bodin et al., 2013; Predieri et al., 2020). Se ha demostrado que la exposición al diclorodifenildicloroetileno (DDE) o al bisfenol A (BPA) aumenta la tasa de incidencia de diabetes en ratones NOD (Bodin et al., 2013; Cetkovic-Cvrlje et al., 2016); mientras que el bifenilo policlorado-153 y la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina frenaron el desarrollo de DT1 en estos mismos ratones (Kerkvliet et al., 2009; Kuiper et al., 2016).

En humanos, los estudios de la acción de los disruptores endocrinos respecto al desarrollo de la DT1 son limitados y muestran resultados contradictorios. Algunos han relacionado la

exposición a químicos, como los bisfenoles, los contaminantes orgánicos persistentes (como pesticidas y bifenilos policlorados) y la contaminación del aire, con mayor riesgo de desarrollar DT1 (Bresson et al., 2022; Keskesiadou et al., 2024). No obstante, un estudio de dos cohortes de niños con elevado riesgo genético de padecer DT1 no obtuvo asociaciones claras entre una mayor exposición a contaminantes químicos al nacer, a los 12 o a los 48 meses de edad, y la inducción de autoinmunidad de las células β o la progresión de esta hacia el debut de DT1 (Salo et al., 2019). Estos datos sirven para reforzar la idea de que para esclarecer tanto estas asociaciones como para poder establecer relaciones causales y modos de acción es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales.

Entre las principales clases de disruptores endocrinos estudiadas en el contexto de la diabetes y la disfunción de células β se incluyen los bisfenoles (como BPA), los ftalatos (como DEHP), los pesticidas organoclorados (como DDE), compuestos fenólicos como el triclosán (TCS) y las sustancias per- y polifluoroalquiladas (como PFOA) (Dagar et al., 2023; Hinault et al., 2023; Martínez-Pinna et al., 2023).

El BPA es un compuesto orgánico utilizado principalmente en la fabricación de plásticos. Se encuentra en multitud de productos y materiales como resinas epoxi, policarbonatos de plástico, los tiques de compra y en envases plásticos de alimentos y bebidas. Debido a su uso tan extendido es un residuo ubicuo en el medio ambiente. El BPA puede alterar la secreción de insulina en células β e islotes primarios de ratón al activar receptores de estrógenos y alterar la actividad y expresión de canales iónicos (Alonso-Magdalena et al., 2008; Marroqui, Martínez-Pinna, et al., 2021). La exposición a BPA induce la apoptosis en las células β de manera dependiente de los receptores de estrógenos y altera su capacidad para formar heterodímeros (Babiloni-Chust et al., 2022). Además, en islotes primarios de ratón, el BPA provoca disfunción mitocondrial al inhibir la expresión de genes relacionados con su actividad, resultando en una reducción de la secreción de insulina en respuesta a estímulos con glucosa y un aumento de la apoptosis (Carchia et al., 2015). Adicionalmente, en las líneas celulares EndoC- β H1 e INS-1E, el BPA es capaz de aumentar la producción de ERO a concentraciones de 1 nM y 1 μ M (Dos Santos et al., 2022).

Los pesticidas organoclorados son compuestos sintéticos cuya estructura generalmente consta del esqueleto de un hidrocarburo al que se le sustituyen uno, o más, átomos de hidrógeno por cloro. Entre ellos encontramos el diclorodifeniltricloroetileno (DDT), que fue el primer pesticida sintético en ser utilizado, y el DDE, uno de sus metabolitos. Su uso fue prohibido en la década de los 70 debido a su gran persistencia tanto en el medio ambiente como en los humanos, así como por su acumulación en la cadena trófica y efectos en los animales (Beard, 2006). Se demostró en ratones NOD, que dosis crónicas elevadas de DDE provocaron un aumento significativo en la gravedad de la hiperglicemia, así como la incidencia de DT1 (Cetkovic-Cvrlje et al., 2016). Respecto a sus efectos sobre las células β pancreáticas,

se ha comprobado en la línea celular de rata INS-1E que la exposición a concentraciones no letales de DDT o DDE alteró la secreción y el contenido de insulina (Y.-M. Lee et al., 2017). Además, el DDE aumentó la secreción de insulina en la línea celular humana EndoC- β H1 a concentraciones de 10 nM y 1 μ M (Dos Santos et al., 2022), así como en la de ratón β -TC-6 (Ward et al., 2021).

Los ftalatos son compuestos químicos utilizados en la fabricación de productos plásticos para aumentar su flexibilidad. El DEHP es el ftalato más común y podemos encontrarlo en aparatos médicos, juguetes, así como en productos cosméticos y de cuidado personal (Earls et al., 2003; Koniecki et al., 2011). En la línea de células de rata INS-1 se ha comprobado que la exposición a DEHP disminuye la secreción de insulina e induce apoptosis de manera significativa y dependiente de dosis mediante la activación de vías de respuesta a estrés de retículo (Sun et al., 2015). En la línea celular MIN6 se observaron descensos en la viabilidad celular tras exponer las células a 10 μ M DEHP (Al-Abdulla et al., 2022).

El TCS es un compuesto organoclorado utilizado como agente antibacteriano y conservante en productos cosméticos y de higiene personal como pastas de dientes, colutorios, geles de ducha y desodorantes. Respecto a sus efectos en células β , en la línea celular de ratón MIN6 se ha reportado que el TCS es capaz de inducir muerte celular por necrosis a concentraciones superiores a 17 μ M (Ajao et al., 2015). Por otro lado, la exposición a concentraciones de hasta 1 μ M no resultó en cambios en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Dos Santos et al., 2022).

Las sustancias per- y polifluoroalquiladas son cadenas de carbonos perfluorados sintetizadas químicamente. Uno de los más sintetizados y estudiados es el PFOA, un producto industrial utilizado como agente tensioactivo desde mediados del siglo XX. Estas sustancias podemos encontrarlas en productos de limpieza e higiene personal, pinturas, barnices y, principalmente, en los aislantes antiadherentes de las sartenes de teflón. Respecto a los efectos del PFOA en células β , en la línea celular MIN6 induce su apoptosis y disminuye la secreción de insulina al ser estimulada por glucosa (He et al., 2022). En las líneas celulares EndoC- β H1e INS-1E, es capaz de inducir apoptosis a concentraciones entre 20 y 200 μ M. Además, es capaz de disminuir la secreción de insulina en condiciones de alta y baja glucosa de forma no monotónica respecto a la dosis, pues concentraciones bajas, de 10 pM hasta 100 nM, redujeron la secreción, pero concentraciones 1 μ M no (Dos Santos et al., 2022).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Se ha demostrado, tanto en líneas celulares pancreáticas como en animales, que los disruptores endocrinos de manera individual son capaces de afectar al desarrollo, función (por ejemplo, la secreción de insulina estimulada por glucosa) y/o la supervivencia de las células β incluso con exposición a dosis bajas ($< 1 \mu$ M) (Al-Abdulla et al., 2022; Dos Santos

et al., 2022; Heindel et al., 2017; Martínez-Pinna et al., 2023; Nadal et al., 2017). Sin embargo, los humanos no estamos sometidos a una única forma de contaminación ambiental y nos vemos expuestos de manera simultánea a multitud de químicos de fuentes diversas: el aire, el agua y los alimentos que consumimos; así como productos cosméticos y de uso diario. Esta exposición habitual a combinaciones de químicos lleva a pensar en los posibles efectos que puedan tener estas mezclas de sustancias en la salud de las personas (D.-H. Lee & Jr, 2019; Luijten et al., 2023; Ribeiro et al., 2017). Cabe destacar la escasez de estudios testando el efecto de mezclas de disruptores endocrinos en células β y los que hay, emplearon una mezcla de bifenilos policlorados conocida como Aroclor 1254. Demostraron que el Aroclor 1254 aumentó los niveles intracelulares de Ca^{2+} y redujo tanto el contenido de insulina como su secreción estimulada por glucosa (Hoyeck et al., 2022).

Una crítica habitual a los estudios sobre la exposición a disruptores endocrinos sobre las células β es que no suelen analizar mezclas complejas, sino compuestos individuales o, como en el caso del Aroclor 1254, mezclas de compuestos de la misma clase (Howard, 2019; Predieri et al., 2020). Además, algo para tener en cuenta es que las concentraciones utilizadas suelen ser mucho más altas que las observadas en humanos. Por este motivo, el presente trabajo pretende indagar en los potenciales efectos de una mezcla de disruptores endocrinos compuesta por BPA, DDE, DEHP, TCS y PFOA en células β humanas, de ratón y rata (EndoC- β H1, MIN6, INS-1E, respectivamente) en un contexto que mimetiza la infección viral que puede desencadenar la DT1. Más específicamente, el presente trabajo plantea como objetivos:

- Comprobar si una mezcla de disruptores endocrinos altera la supervivencia de las células β .
- Investigar posibles mecanismos implicados en la supervivencia de las células β tras el tratamiento con la mezcla de disruptores endocrinos.
- Estudiar si la mezcla de disruptores endocrinos altera los efectos de un mimético de infecciones virales, el PIC, sobre la supervivencia y función de las células β .
- Investigar posibles mecanismos implicados en la supervivencia de las células β tras el tratamiento con combinación de la mezcla de disruptores endocrinos con el PIC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos realizados en el presente trabajo han sido aprobados por el comité ético de la UMH bajo el código TFM.MBB.RSDS.AMG.250513.

Manejo y uso de células: EndoC- β H1, INS-1E y MIN6

En el trabajo se han utilizado tres líneas celulares de células β pancreáticas: EndoC- β H1, INS-1E y MIN6.

La EndoC- β H1 (RRID: CVCL_L909; Univercell-Biosolutions, Francia) es una línea de células β humana obtenidas de yemas pancreáticas embrionarias humanas empleando el vector lentiviral SV40LT para generar insulinomas. Estas células secretan insulina en respuesta a glucosa y expresan factores de transcripción característicos de células β como PDX1 (Ravassard et al., 2011).

Para su mantenimiento se empleó medio de cultivo comercial DMEM, que contiene 5,5 mM de glucosa, cuya composición se describe en la Tabla 1. Para su uso en los tratamientos se suplementó con 2% de suero bovino fetal inactivado (FBS; Cytiva, EE. UU, Ref: SV30160.03). El medio utilizado en los tratamientos donde se han realizado transfecciones contiene los mismos compuestos a excepción de la penicilina, estreptomycin y la seroalbúmina bovina (BSA).

| Compuesto | Concentración | Referencia |
|---|----------------|---------------------|
| DMEM (5,5 mM glucosa) | - | 31885023 (Gibco) |
| Transferrina humana | 5,5 μ g/mL | T8158 (Sigma) |
| Nicotinamida | 10 mM | N0636 (Sigma) |
| Selenito sódico | 6,7 ng/mL | S1382 (Sigma) |
| β-2-Mercaptoetanol | 50 μ M | M3148 (Sigma) |
| Penicilina/Estreptomycin | 100 U/mL | 15140-122 (Gibco) |
| BSA fracción V. Libre de ácidos grasos | 2% p/v | 10775835001 (Merck) |

Tabla 1. Composición del medio de cultivo de la línea celular EndoC- β H1.

Las células EndoC- β H1 fueron sembradas sobre un recubrimiento de Matrigel, y cuya composición se describe en la Tabla 2. Este se deja durante 3 h a 37 °C para que se polimericen la fibronectina y matriz extracelular que lo componen. Este proceso se realizó tanto para su siembra en placas como para el mantenimiento de la línea celular en botes.

| Compuesto | Concentración | Referencia |
|--------------------------------------|---------------|------------------------|
| DMEM (4,5 g/L glucosa) | -- | DMEM-HPSTA (Capricorn) |
| Matriz extracelular | 1 % v/v | E1270 (Sigma) |
| Fibronectina bovina de plasma | 2 μ g/mL | F1141 (Sigma) |
| Penicilina/Estreptomycin | 50 U/mL | 15140-122 (Gibco) |

Tabla 2. Composición del recubrimiento de Matrigel usado en la línea celular EndoC- β H1.

La INS-1E (RRID: CVCL_0351; cedida por el Dr. C. Wollheim, Departamento de Fisiología Celular y Metabolismo, Universidad de Ginebra, Ginebra, Suiza) es una línea clonal de células β de rata provenientes de células parentales INS-1. Presentan secreción de insulina en respuesta a glucosa en concentraciones fisiológicas (Merglen et al., 2004).

Para su mantenimiento se utilizó medio comercial RPMI 1640 GlutaMAX™ que se suplementó conforme se indica en la Tabla 3. El medio utilizado en los tratamientos donde se han realizado transfecciones contiene los mismos compuestos a excepción de la penicilina y estreptomycin.

| Compuesto | Concentración | Referencia |
|--|---------------|-------------------|
| RPMI 1640 GlutaMAX™ | - | 61870036 (Gibco) |
| HEPES | 10 mM | 15630-080 (Gibco) |
| Sodio-piruvato | 1 mM | S1382 (Sigma) |
| β-2-Mercaptoetanol | 50 μ M | M3148 (Sigma) |

| | | |
|----------------------------------|---------|---------------------|
| Penicilina/Estreptomicina | 50 U/mL | 15140-122 (Gibco) |
| FBS | 5% v/v | SV30160.03 (Cytiva) |

Tabla 3. Composición del medio de cultivo de la línea celular INS-1E.

La MIN6 (RRID: CVCL_0431, ATCC, EE. UU.) es una línea de células β de ratón obtenidas de un insulinoma provocado por expresión dirigida del gen T de SV40. Presenta secreción de insulina inducida por glucosa (Miyazaki et al., 1990).

Para su mantenimiento se empleó medio comercial DMEM optimizado, que contiene 4,5 g/L de glucosa, y cuya composición se indica en la Tabla 4. El medio utilizado en los tratamientos donde se han realizado transfecciones contiene los mismos compuestos a excepción de la penicilina y estreptomicina.

| Compuesto | Concentración | Referencia |
|--|----------------------|------------------------|
| DMEM (4,5 g/L glucosa) | - | DMEM-HPSTA (Capricorn) |
| L-glutamina | 2 mM | T8158 (Sigma) |
| Bicarbonato de sodio | 1,5 g/L | N0636 (Sigma) |
| Sodio-piruvato | 2 mM | S1382 (Sigma) |
| β-2-Mercaptoetanol | 50 μ M | M3148 (Sigma) |
| Penicilina/Estreptomicina | 100 U/mL | 15140-122 (Gibco) |
| FBS No inactivado | 15% v/v | SV30160.03 (Cytiva) |

Tabla 4. Composición del medio de cultivo de la línea celular MIN6.

Para cada experimento se sembraron las células a densidades diferentes en los pocillos (Tabla 5). Todas las líneas celulares fueron mantenidas a 37 °C en un ambiente húmedo al 95 % y 5 % en CO₂.

| Experimento | Línea celular | Concentración (células/pocillo) | Tipo de placa |
|---------------------------------------|----------------------|--|----------------------|
| Viabilidad celular | EndoC- β H1 | 4,5*10 ⁴ | 96 pocillos |
| | INS-1E | 1,5*10 ⁴ | |
| | MIN6 | 1,5*10 ⁴ | |
| Producción de ROS intracelular | EndoC- β H1 | 4,5*10 ⁴ | 96 pocillos negra |
| | INS-1E | 1,5*10 ⁴ | |
| | MIN6 | 1,5*10 ⁴ | |
| Secreción de insulina | MIN6 | 2*10 ⁵ | 24 pocillos |
| Expresión proteica | EndoC- β H1 | 1*10 ⁵ | 24 pocillos |
| | INS-1E | 1*10 ⁵ | 24 pocillos |

Tabla 5. Células sembradas para los experimentos realizados en las diferentes líneas celulares.

Tratamientos celulares

Las células se trataron con una mezcla de disruptores endocrinos compuesta por: BPA (Ref: 239658), TBT (Ref: T50202), PFOA (Ref: 77262), DEHP (Ref: 36735), TCS (Ref: PHR1338) y DDE (Ref: 123897) obtenidos de Sigma-Aldrich (Barcelona, España). Partiendo de un stock comercial de cada compuesto, se preparó una mezcla equimolar de concentración final 100 mM. Se disolvieron en DMSO para uso en cultivo celular, estéril y filtrado y se prepararon alícuotas que se mantuvieron a -20 °C hasta su utilización.

Para poder estudiar el efecto de la mezcla de disruptores endocrinos sobre las infecciones virales se empleó el PIC de alto peso molecular (InvivoGen, EE. UU, Ref: tlr1-pic), que se preparó en agua bidestilada según recomendación del fabricante.

Con estos tratamientos se intentaron mimetizar los efectos de las infecciones virales dentro de las células (Figura 5). Para ello se debe transportar el PIC a su interior utilizando la lipofectamina, un reactivo lipídico catiónico empleado para la transfección de ácidos nucleicos en células eucariotas.

Los reactivos utilizados se prepararon según los pasos descritos a continuación:

1. Dilución de la lipofectamina 2000 (Thermo Fisher, Ref: 11668027) en medio de cultivo Opti-MEM (Gibco, Ref: 15392402) para obtener por pocillo:
 - En placas de 96 pocillos: 0,15 μ L de lipofectamina/10 μ L de Opti-MEM.
 - En placas de 24 pocillos: 0,5 μ L de lipofectamina/50 μ L de Opti-MEM.
2. Incubación de 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Dilución del PIC de un stock 1 mg/mL para utilizarlo a 10 μ g/mL en medio de cultivo Opti-MEM®.
4. Incubación conjunta de lipofectamina:Opti-MEM o lipofectamina:PIC a partes iguales durante 20 minutos a temperatura ambiente.
5. Preparación de diluciones 1,25 μ M de la mezcla de disruptores endocrinos en medio de transfección propio de cada línea celular. Es importante notar que se preparó la misma dilución para el DMSO, el vehículo usado en este estudio.
6. Preparación de una mezcla entre los reactivos del paso 4 (lipofectamina:Opti-MEM o lipofectamina:PIC) y los del paso 5 (DMSO 0,00125 % o mezcla de disruptores endocrinos a 1,25 μ M) en proporciones 1:4 (v/v) para obtener una concentración final DMSO del 0,001 % y de la mezcla de disruptores endocrinos de 1 μ M.

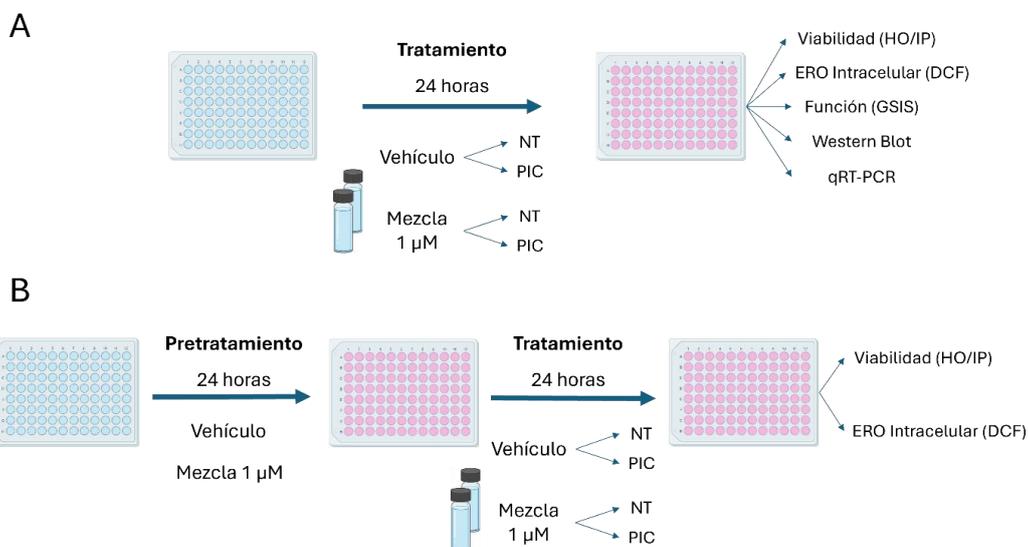


Figura 5. Esquema de los tratamientos realizados en las diferentes líneas celulares y los ensayos realizados. En (A) las células fueron tratadas durante 24 horas con Vehículo (DMSO) o la mezcla de disruptores endocrinos (Mezcla 1 μ M) con y sin PIC. En (B) las células fueron pretratadas durante 24 horas con Vehículo (DMSO) o la mezcla de disruptores endocrinos (Mezcla 1 μ M). Posteriormente, fueron tratadas nuevamente durante 24 horas con Vehículo (DMSO) o la mezcla de disruptores endocrinos (Mezcla 1 μ M) con y sin PIC.

Viabilidad celular mediante tinciones de unión al ADN

Se empleó una tinción nuclear diferencial con Hoechst 33342 (HO; Invitrogen, Ref: H1399) y ioduro de propidio (IP; Merck, Ref: P4170), dos fluoróforos intercalantes del ADN, para evaluar la viabilidad de las células β (Dos Santos et al., 2022). Esta técnica se basa en la diferente permeabilidad de las células a HO/IP. HO es un fluoróforo azul permeable a las membranas biológicas y capaz de unirse a regiones del ADN con abundante adenina-timina (Lema et al., 2011). La unión de HO al ADN permite distinguir tanto células viables como células en etapas tempranas de apoptosis. En núcleos apoptóticos tempranos la condensación de la cromatina aporta un color azul intenso y morfología pequeña, pudiendo diferenciarlas así de las viables. IP es un fluoróforo rojo; las células vivas son impermeables al IP, así que este tiñe únicamente células con la membrana plasmática comprometida como las apoptóticas tardías (Figura 6). Los reactivos fueron preparados partiendo de un stock de 1 mg/mL en PBS. Se preparó una solución de 10 μ g/mL de cada fluoróforo (HO/IP) para MIN6 e INS-1E y de 20 μ g/mL para EndoC- β H1. Las células se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Tras este tiempo, se reemplazó la mitad del volumen del pocillo con medio sin HO/IP. Seguidamente se cuantificó la apoptosis mediante conteo directo de las células en un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss Axio Observer) acoplado a un diodo láser (Zeiss Colibri 7). Para cada condición experimental, dos observadores diferentes, siendo uno ajeno a la identidad de la muestra, contarán al menos 600 células, según se describe en (Santin et al., 2016). Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de apoptosis respecto al número total de células contadas.

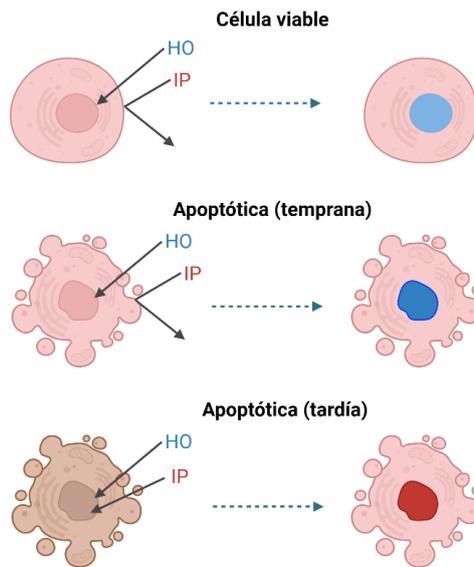


Figura 6. Esquema del funcionamiento de la tinción nuclear con HO/IP. Las membranas celulares de las células viables son impermeables al IP, pero no al Hoechst 33342, tiñendo así los núcleos de azul. Las células apoptóticas tardías tienen las membranas celulares comprometidas y son permeables tanto a HO como al IP, dando lugar a núcleos teñidos de rojo.

El índice de apoptosis se determinó a partir de los porcentajes de células apoptóticas obtenidos en cada condición experimental y en los controles. Este parámetro se calculó según la siguiente fórmula (Liu et al., 2000; Ortis et al., 2006):

$$\left(\frac{\% \text{ Células apoptóticas tras tratamiento con PIC} - \% \text{ Células apoptóticas en control sin PIC}}{100 - \% \text{ Células muertas en control sin PIC}} \right) * 100$$

Ensayo de producción de ERO intracelular con sonda DCF

Para el estudio de la producción de ERO intracelular en células β se utilizó la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich, Ref: D6883; Dos Santos et al., 2023). El stock de DCF fue preparado en etanol 100% a 5 mM.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos negras y, tras haber realizado los tratamientos correspondientes, se incubaron con DCF 10 μ M durante 30 minutos a 37 °C. Para cuantificar la fluorescencia se utilizó un lector de placas POLARSTAR (BMG Labtech). Una vez cuantificada, se obtuvo la cantidad total de proteína en cada pocillo. Para ello, se lavaron las células con PBS frío, se añadieron 50 μ L de H₂O bidestilada a cada pocillo y se congeló la placa al menos durante 24 horas antes de recoger los lisados celulares para cuantificar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Los resultados se expresaron como fluorescencia normalizada por el total de proteína.

Secreción de insulina estimulada por glucosa

Para estudiar el efecto de la mezcla de disruptores endocrinos y el PIC sobre la función de la célula β se llevó a cabo un ensayo de secreción de insulina estimulada por glucosa. Se realizó tras las 24 horas del tratamiento previamente descrito en células MIN6 sembradas.

Antes de aplicar los estímulos de glucosa, las células fueron lavadas con medio Krebs-Ringer (115 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5 mM KCl, 24 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES y 0,1% BSA; pH 7.4) y posteriormente incubadas durante 2 horas en el mismo medio Krebs-Ringer. Durante esta incubación, se prepararon dos estímulos secretores en el medio Krebs-Ringer: uno con concentración de glucosa no estimuladora (1.67 mM glucosa) y otro con una concentración de glucosa que estimule la secreción de insulina (16.7 mM glucosa).

Tras la incubación inicial en medio Krebs-Ringer sin glucosa, las células se incubaron secuencialmente con el medio con 1.67 mM glucosa y luego en medio con 16.7 mM glucosa, durante 30 minutos cada una. Al finalizar cada incubación, se recogió el medio, se puso en hielo y se centrifugó durante 5 minutos a 4 °C y 1400 g. El sobrenadante se puso en un tubo nuevo y fue congelado a -20 °C hasta la realización de un ensayo ELISA para medir la cantidad de insulina.

Para cuantificar la insulina secretada se empleó un kit comercial de ELISA para insulina de ratón (Merckodia, Uppsala, Suecia), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Se emplearon 10 μ L de muestra diluidas 1/25 en Calibrador 0, proporcionado por el fabricante, para ajustarse al rango de detección del kit. La medición de la absorbancia se llevó a cabo con un lector de placas espectrofotométrico (iMark Microplate Reader, Bio-Rad). Los resultados obtenidos se normalizaron utilizando el contenido de proteína total, analizado mediante el método Bradford descrito anteriormente.

Cuantificación de proteína total

La cantidad de proteína total fue obtenida mediante el método de cuantificación de proteínas Bradford (Bradford, 1976). Esta técnica de espectrofotometría se fundamenta en el cambio en el espectro de absorción del compuesto Coomassie Blue G-250 al interactuar con aminoácidos básicos y ácidos de las proteínas solubles de la muestra. Se distingue un cambio de color en el reactivo: de marrón a azul. El método presenta una sensibilidad de 5 μ g/mL o 1-10 μ g de proteína.

El procedimiento experimental para la cuantificación de proteína fue el siguiente:

1. Preparar una recta de calibrado de concentraciones conocidas de BSA en agua destilada (de 0 a 0,5 mg/mL).
2. Añadir 10 μ L de la recta de calibrado o de la dilución correspondiente de la muestra en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos.

3. Añadir 200 µl de reactivo Bradford a cada pocillo. Esperar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Medir la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm con un lector de placas iMark Microplate Reader (Biorad, EE. UU).

Se realizaron duplicados técnicos de las muestras y la recta de calibrado en todos los experimentos.

Determinación de la expresión de ARN por PCR cuantitativa (qPCR)

Para recoger los lisados celulares se utilizó el tampón de lisis RA1, componente del kit NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, Alemania) con un 1% de β-mercaptoetanol (v/v) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

La extracción del ARN se realizó con el kit de extracción comercial NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel). El protocolo realizado fue el establecido en el kit comercial:

1. Poner las columnas en tubos colectores. Transferir las muestras a columnas de filtrado. Centrifugar 1 minuto a 11.000 g (Centrifuge 5417C, Eppendorf).
2. Añadir 100 µL de etanol 70% en cada una de las muestras filtradas. Asegurarse de homogenizar correctamente mediante pipeteo.
3. Transferir las muestras a columnas de purificación. Centrifugar 30 segundos a 11.000 g. Descartar el eluido. Colocar la columna en el tubo colector.
4. Añadir 350 µL de tampón MDB sobre cada columna. Centrifugar 1 minuto a 11.000 g. Descartar el eluido. Colocar la columna en el tubo colector.
5. Añadir 95 µL de la mezcla de DNAsa sobre cada columna. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Añadir 200 µL del tampón RAW2 en cada columna. Centrifugar 30 segundos a 11.000 g. Descartar el eluido. Colocar la columna en el tubo colector.
7. Añadir 600 µL del tampón RA3 en cada columna. Centrifugar 30 segundos a 11.000 g. Descartar el eluido. Colocar la columna en el tubo colector.
8. Añadir 250 µL del tampón RA3 en cada columna. Centrifugar 2 minutos a 11.000 g. Descartar el eluido. Colocar la columna en el tubo colector.
9. Centrifugar 2 minutos a 11.000 g. Descartar el eluido. Colocar las columnas en tubos de 1,5 mL.
10. Añadir sobre la membrana 20 µL de tampón de elución de ARN. Centrifugar 1 minuto a 11.000 g.

En caso de no realizar la retrotranscripción del ARN seguidamente, almacenar las muestras a -80 °C.

Para la retrotranscripción del ARN se empleó el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™, EE. UU). Primero se preparó la *Máster mix* (Tabla 6)

en un tubo libre de ARNasas. En tubos de 200 μ L se añadieron, por cada muestra, 6,3 μ L de la Máster mix y 13,7 μ L del ARN.

| Compuesto | Volumen (μ L) |
|--------------------------|--------------------|
| 10x Tampón RT | 2,0 |
| 25x dNTPS (100 mM) | 0,8 |
| 10x Hexámeros aleatorios | 2,0 |
| Multiscribe™ RT | 1,0 |
| Inhibidor de ARNasas | 0,5 |

Tabla 6. Composición de la Máster mix empleada en la retrotranscripción del ARN.

Se realizó la retrotranscripción de los 20 μ L de cada tubo en un termociclador (Termociclador T100™, Bio-Rad) siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 7.

| | Temperatura (°C) | Tiempo (minutos) |
|---------------|------------------|------------------|
| Paso 1 | 25 | 10 |
| Paso 2 | 37 | 120 |
| Paso 3 | 85 | 5 |
| Paso 4 | 4 | ∞ |

Tabla 7. Ciclos de tiempos y temperaturas empleados para la retrotranscripción del ARN.

Para la qPCR se empleó la Máster mix comercial *Iq SYBR Green SuperMIX (2X)* (Applied Biosystems™, EE. UU). Esta contiene un agente intercalante del ADN que permite seguir su amplificación gracias a su capacidad de emitir fluorescencia a 522 nm cuando es excitado a 498 nm.

Se utilizó una placa de 96 pocillos divisibles. En cada uno de los pocillos se añadieron los reactivos descritos en la Tabla 8. Los cebadores se utilizaron a una concentración final 2 μ M y son específicos para cada gen de interés (Tabla 9).

| Compuesto | Volumen (μ L) |
|---------------------------|--------------------|
| Iq SYBR Green SuperMIX 2X | 5 |
| Cebador Forward | 0,2 |
| Cebador Reverse | 0,2 |
| H ₂ O (DEPC) | 3,6 |
| ADNc | 1 |

Tabla 8. Contenido de cada pocillo de la placa de 96 pocillos utilizada para la qPCR.

| Cebador (especie) | Dirección | Secuencia (5'-3') |
|---------------------|-----------|------------------------|
| <i>Gapdh</i> (rata) | Forward | AGTTCAACGGCACAGTCAAG |
| <i>Gapdh</i> (rata) | Reverse | TACTCAGCACCAGCATCACC |
| <i>Bip</i> (rata) | Forward | ACCTCAGTCTCCCAGCTAAT |
| <i>Bip</i> (rata) | Reverse | CCCTTGCCTGAGTAAAGATGT |
| <i>Chop</i> (rata) | Forward | AACGGAAACAGAGTGGTCATT |
| <i>Chop</i> (rata) | Reverse | GCTTGAGCCGTTTCATTCTCT |
| <i>Xbp1s</i> (rata) | Forward | CCGCAGCAGGTGCAGG |
| <i>Xbp1s</i> (rata) | Reverse | GAGTCAATACCGCCAGAATCCA |

Tabla 9. Cebadores utilizados en las reacciones de qPCR.

Para la reacción de PCR se empleó un termociclador (C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad) con un lector de fluorescencia acoplado (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad). El protocolo seguido se describe en la Tabla 10.

| | Temperatura (°C) | Tiempo |
|---------------|---|-------------|
| Paso 1 | 95 | 3 minutos |
| Paso 2 | 95 | 15 segundos |
| Paso 3 | 60 | 1 minuto |
| Paso 4 | x40 veces los pasos 2 y 3 | |
| Paso 5 | Aumento 55 °C a 95 °C en intervalos de 0,5 °C cada 5 segundos | |

Tabla 10. Ciclos de tiempos y temperaturas empleados para la qPCR.

Determinación de la expresión de proteínas por Western blot

Para la detección específica de proteínas se utilizó la técnica Western blot en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Una vez realizados los tratamientos descritos anteriormente, las células se lavaron con PBS frío y fueron lisadas con tampón Laemmli (2 % glicerol p/v, 12.5 mM Tris pH 8.0, 20 mM DTT, 0.4 % SDS p/v, 0.04 mg/mL azul de bromofenol, 2 % v/v β -2-mercaptoetanol en agua bidestilada).

Las muestras fueron descongeladas y se desnaturizaron las proteínas durante 10 minutos a 99 °C. A continuación, se realizó la electroforesis con geles al 12% en poliacrilamida. Con el gel embebido en tampón de electroforesis (2,5 mM Tris pH 8,6, 19 mM L-Glicina, 0,01 % p/v SDS en agua bidestilada), se aplicó inicialmente una corriente de 90 V durante 20 minutos, luego se aumentó a 120 V y se mantuvo durante aproximadamente 90 minutos.

Posteriormente, se activó con metanol una membrana de fluoruro de polivinilideno (Amersham™, EE. UU) para poder transferir el gel mediante un protocolo de transferencia húmeda durante 90 minutos a 90 V. Tanto el gel como la membrana estuvieron embebidos en tampón de transferencia frío (25 mM Tris Base, 190 mM L-Glicina, 20% metanol v/v, 0,1 % (p/v) SDS en agua destilada) durante la transferencia. Además, la cubeta se cubrió en hielo para evitar su sobrecalentamiento.

Finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en tampón TBS-T (10 mM Tris Base, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20 en agua bidestilada) a temperatura ambiente y agitación constante durante 1 hora. Tras el bloqueo, se lavaron tres veces durante 10 minutos con tampón TBS-T y se incubaron toda la noche en agitación constante a 4 °C en una solución de BSA 5% (p/v) en tampón TBS-T con los anticuerpos primarios (Tabla 11). Estos fueron preparados en tampón tampón TBS-T suplementado con 5% BSA (p/v) a las diluciones indicadas en la Tabla 11.

| Diana | Referencia | Especie | Dilución | RRID |
|--------------------|----------------------------|---------|----------|-------------|
| Bcl-xL | Cell Signaling (Ref: 2764) | Conejo | 1:1000 | AB_2228008 |
| Bcl-2 | Cell Signaling (Ref: 3498) | Conejo | 1:1000 | AB_1903907 |
| STAT1 | Cell Signaling (Ref: 9172) | Conejo | 1:1000 | AB_2198300 |
| α -Tubulina | Merck (Ref: T5168) | Ratón | 1:5000 | AB_477579 |
| Vinculina | Merck (Ref: SAB4200080) | Ratón | 1:5000 | AB_10604160 |

Tabla 11. Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot.

Al día siguiente se recogieron los anticuerpos primarios y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con tampón TBS-T. Después, se incubó la membrana a temperatura ambiente y agitación constante durante 1 hora con una solución al 5% de leche en tampón TBS-T del anticuerpo secundario correspondiente según el anticuerpo primario (Tabla 12).

| Diana | Referencia | Especie | Dilución | RRID |
|--------|---|---------|----------|-------------|
| Conejo | Bio-rad (Ref: 170-6515) | Cabra | 1:5000 | AB_11125142 |
| Ratón | Jackson ImmunoResearch (Ref: 715-165-150) | Asno | 1:5000 | AB_2340813 |

Tabla 12. Anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot.

La detección específica de las bandas se realizó añadiendo sustrato químico luminiscente de la peroxidasa de rábano (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific™) y se detectó su señal en un transiluminador (Chemi Doc MP, Bio-Rad). Las imágenes obtenidas se cuantificaron con el software UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific Inc., EE. UU.).

Análisis estadístico

Los resultados del trabajo se representan como media \pm SEM en gráficos XY y de barras. En estos últimos los valores individuales de cada experimento se indican con símbolos sobre las barras. Los resultados fueron analizados y graficados utilizando GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Las comparaciones entre grupos se realizaron con test paramétricos cuando los datos se ajustaban a una distribución normal, se utilizaron t-test pareados, one-way y two-way ANOVA. Se consideró como estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

La exposición a la mezcla de disruptores endocrinos indujo la apoptosis en células β .

Primeramente, se quiso estudiar la concentración más adecuada para trabajar con la mezcla de disruptores endocrinos. Basándonos en datos previos de nuestro grupo y otros (Al-Abdulla et al., 2022; Dos Santos et al., 2022, 2023), se decidió testar dos concentraciones de la mezcla: 1 nM y 1 μ M, las cuales son ambientalmente relevantes porque se sitúan dentro de un rango de concentraciones establecido a partir de estudios de biomonitorización para cada compuesto. Como primer paso, se evaluó la viabilidad celular tras la exposición a la mezcla durante 24 h. Al analizar el porcentaje de apoptosis mediante la técnica de HO/PI, se observó que la apoptosis basal en la línea celular EndoC- β H1 fue cercana al 12 %, mientras que en INS-1E no sobrepasó el 3 %. Tanto en EndoC- β H1 como en INS-1E, la mezcla de disruptores provocó un aumento de la apoptosis (Figura 7A y B). Sin embargo, solo se observó un aumento significativo de 1,3 veces en la apoptosis a concentración 1 μ M en EndoC- β H1 (Figura 7A). En INS-1E (Figura 7B). A pesar de que la mezcla a concentración 1 μ M provocó

un aumento de 3,5 veces en la apoptosis, este no es significativo debido a la dispersión que presenta.

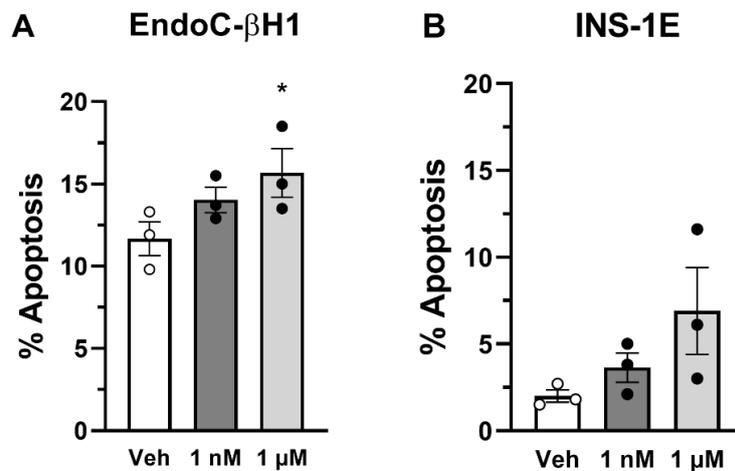


Figura 7. Análisis de la viabilidad celular en las células EndoC-βH1 e INS-1E tras la exposición a la mezcla de disruptores endocrinos. Las células EndoC-βH1 (A) e INS-1E (B) fueron tratadas durante 24 h con Vehículo (barras blancas) o dos concentraciones de la mezcla de disruptores endocrinos: 1 nM (barras grises oscuras) y 1 μM (barras grises). Los resultados son medias ± SEM de tres experimentos independientes. * $p \leq 0.05$, vs Veh, analizado mediante one-way ANOVA.

La mezcla de disruptores a concentraciones 1 nM y 1 μM no alteró la producción de ERO intracelular en células β.

Para complementar los datos obtenidos con el ensayo de viabilidad celular, se evaluó si la mezcla de disruptores endocrinos alteraba la producción de ERO intracelular. En comparación con las células tratadas con vehículo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de ERO en ninguno de los dos modelos celulares, EndoC-βH1 (Figura 8A) e INS-1E (Figura 8B), a ambas concentraciones evaluadas.

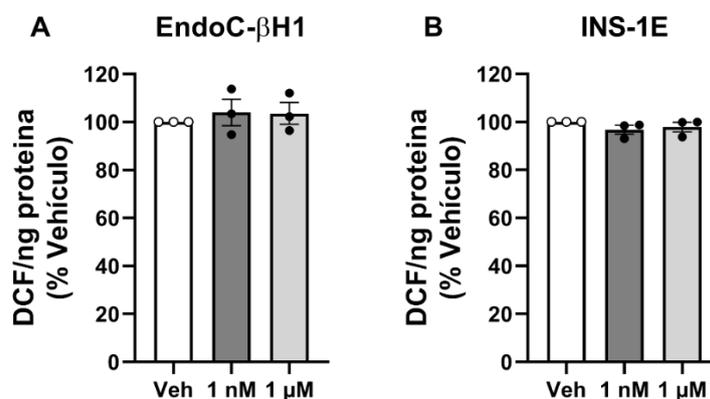


Figura 8. Análisis de la producción de ERO en las células EndoC-βH1 e INS-1E tras la exposición a la mezcla de disruptores endocrinos. Las células EndoC-βH1 (A) e INS-1E (B) fueron tratadas durante 24 h con Vehículo (barras blancas) o dos concentraciones de la mezcla de disruptores endocrinos: 1 nM (barras grises oscuras) y 1 μM (barras grises). Se muestran los valores de fluorescencia de DCF

normalizados por la cantidad de proteína, considerando como 100 % la condición control con vehículo. Los resultados son medias \pm SEM de tres experimentos independientes.

La mezcla de disruptores endocrinos no cambió la expresión de las proteínas Bcl-xL y Bcl-2.

Para los siguientes experimentos en las células INS-1E y EndoC- β H1, se decidió que la concentración a utilizar de la mezcla de disruptores endocrinos sería 1 μ M, ya que fue la única en la que se encontró muerte celular (Figura 7A). Dado que la inhibición de la expresión de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bcl-xL y Bcl-2, juega un papel importante en la supervivencia de las células β (Gurzov & Eizirik, 2011; Perez-Serna et al., 2025), se estudió si el tratamiento con la mezcla de disruptores endocrinos ejercía algún efecto en la expresión de estas dos proteínas (Figura 9A-D).

En las células INS-1E no se observó ninguna diferencia respecto a la expresión de las proteínas Bcl-xL y Bcl-2 tras el tratamiento durante 24 horas con la mezcla de disruptores endocrinos (Figura 9A y B).

Siguiendo con el estudio de los efectos de la mezcla sobre las proteínas de la familia Bcl-2, se hicieron determinaciones de la expresión proteica a diferentes tiempos en las células EndoC- β H1, para comprobar si había cambios a lo largo del tiempo que no pudieran apreciarse en los tratamientos a 24 horas. De nuevo, se observó que no hay diferencias en cuanto a la expresión de Bcl-xL y Bcl-2 en ninguno de los tiempos del ensayo (Figura 9D).

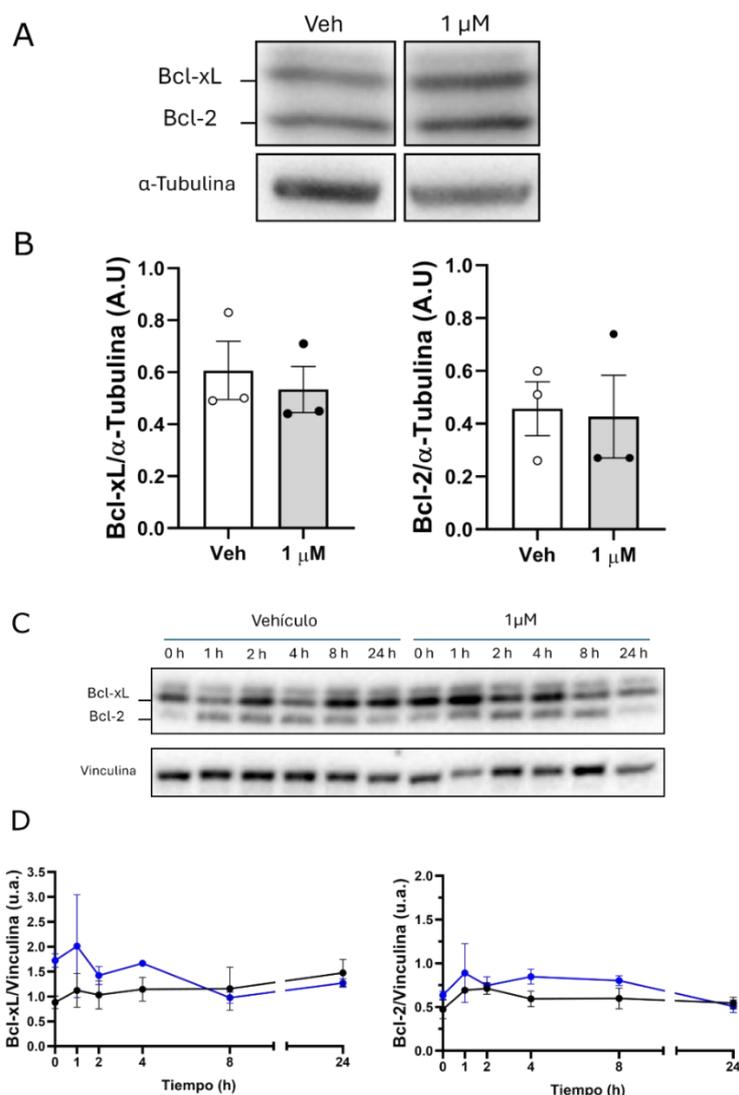


Figura 9. Análisis de la expresión de Bcl-xL ni Bcl-2 en las células INS-1E y EndoC- β H1 tras la exposición a la mezcla de disruptores endocrinos. (A y B) Las células INS-1E fueron tratadas durante 24 h con Vehículo (barras blancas) o la mezcla de disruptores endocrinos a 1 μ M (barras grises). (C y D) Las células EndoC- β H1 fueron tratadas durante 1, 2, 4, 8 o 24 horas con Vehículo (línea negra) o la mezcla de disruptores endocrinos a 1 μ M (línea azul). En (A y C) se muestran imágenes representativas de Bcl-xL, Bcl-2 y α -Tubulina o vinculina. En (B y D) se muestran los valores de densitometría obtenidos para Bcl-xL y Bcl-2. Los valores se normalizaron por α -Tubulina (A y B) o Vinculina (C y D). Los resultados son medias \pm SEM de dos a cuatro experimentos independientes.

El tratamiento con PIC junto a la mezcla de disruptores endocrinos aumentó la apoptosis en células β .

Una vez se decidió la concentración a utilizar de la mezcla de disruptores endocrinos, se quiso comprobar el efecto conjunto del PIC junto a la mezcla respecto a la apoptosis celular. En términos generales, la mezcla de disruptores endocrinos provocó un aumento de la apoptosis en todos los modelos, aunque este solo fue estadísticamente significativo en las

células EndoC- β H1 y MIN6 (Figura 10A y C). Además, pudo observarse como el PIC provocó un aumento significativo de la apoptosis en todas las líneas celulares (Figura 10).

En las células EndoC- β H1, el tratamiento con la mezcla 1 μ M provocó aumentos en los niveles de apoptosis muy similares en ambas condiciones, con y sin PIC, de 1,4 y 1,5 veces, respectivamente, frente al vehículo. El PIC, por sí mismo, aumentó la apoptosis 1,5 veces en las células tratadas con el vehículo, mientras que en el tratamiento con la mezcla lo hace 1,4 veces. Curiosamente, se obtuvieron valores de apoptosis muy similares en las células tratadas solo con la mezcla 1 μ M y solo con PIC (Figura 10A).

Respecto a las células INS-1E, la mezcla de disruptores, por sí misma, no provocó un aumento significativo de la apoptosis, a pesar de suponer un aumento de 2,4 veces. Por su parte, el tratamiento con PIC indujo un aumento significativo de la apoptosis tanto en las células tratadas con el vehículo (7,8 veces) como en las tratadas con la mezcla 1 μ M (5,2 veces) respecto a los mismos tratamientos sin PIC. Así mismo, en los tratamientos con PIC, la mezcla de disruptores endocrinos también provocó un aumento significativo en la apoptosis que no se da en los tratamientos sin PIC (Figura 10B).

Para finalizar, en las células MIN6, el tratamiento con la mezcla 1 μ M sin PIC produjo un valor de apoptosis 2,4 veces mayor que en el vehículo. De la misma forma, el tratamiento con PIC aumentó significativamente la muerte celular, obteniéndose en ambas situaciones, con el vehículo y con la mezcla 1 μ M, valores de apoptosis cercanos al 15 %. Curiosamente, a diferencia de lo observado en las células EndoC- β H1 e INS-1E, el tratamiento con la mezcla de disruptores endocrinos en presencia de PIC no provocó un aumento adicional de la apoptosis (Figura 10C).

Adicionalmente, se calculó el "índice de apoptosis" para las tres líneas celulares (Figura 10D-F). Este índice permite estimar el incremento real de apoptosis inducido por el tratamiento (en nuestro estudio, el PIC), corrigiendo el valor observado en las condiciones experimentales por la apoptosis basal presente en las células control sin PIC. Además, al normalizar con respecto al porcentaje de células viables en el control sin PIC, se evita la sobreestimación del efecto cuando existe mortalidad celular de base. En este estudio, dicho parámetro se utilizó para valorar si la mezcla de disruptores y el PIC producen efectos aditivos o sinérgicos sobre la apoptosis. Tanto en la línea celular EndoC- β H1 como en INS-1E se observó un ligero aumento en el índice de apoptosis, aunque no significativo, en las células tratadas con la mezcla de disruptores endocrinos (Figura 10D y E). Curiosamente, en las células MIN6 observamos un descenso significativo de este índice en aquellas tratadas con la mezcla (Figura 10F).

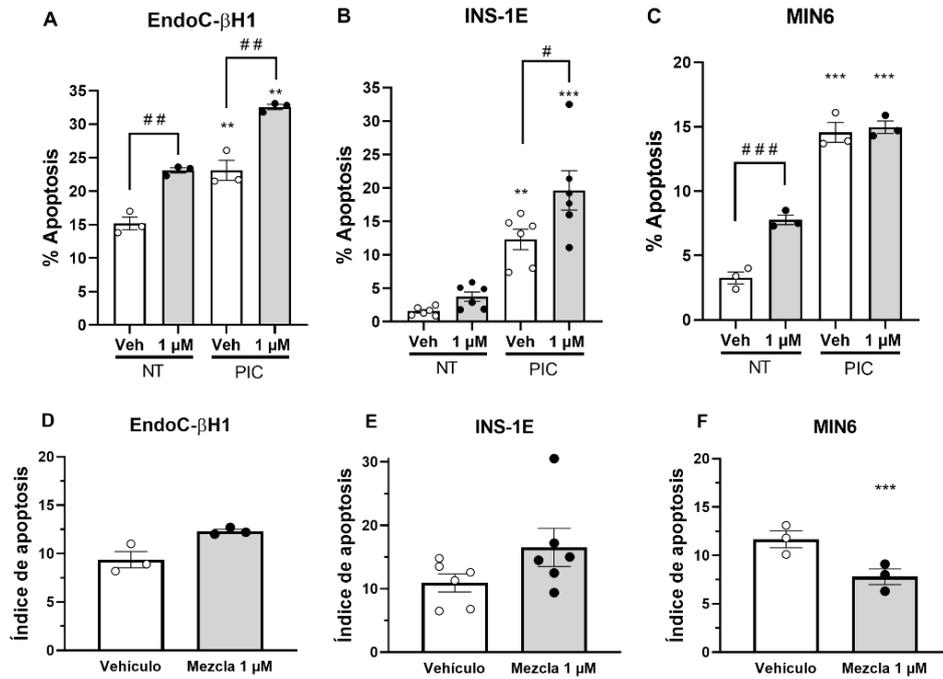


Figura 10. Análisis de la viabilidad celular en las células EndoC-βH1, INS-1E y MIN6 tras la exposición a la mezcla de disruptores endocrinos y/o PIC. Las células EndoC-βH1 (A y D), INS-1E (B y E) y MIN6 (C y F) fueron tratadas durante 24 h con Vehículo (barras blancas) o la mezcla de disruptores endocrinos a 1 μM (barras grises) con y sin PIC. (A-C) Se muestran los valores de apoptosis en %. (D-F) Se muestran los índices de apoptosis. Los resultados son medias ± SEM de tres a seis experimentos independientes. En (A-C): **p<0.01, ***p<0.001 vs su control sin PIC (NT); #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs su vehículo, analizado mediante two-way ANOVA. En (D-F): ***p<0.001 vs el vehículo, analizado mediante t-test pareado.

El PIC aumentó la producción de ERO intracelular en las células INS-1E, pero no en las células EndoC-βH1 y MIN6.

De nuevo, se evaluó si la mezcla de disruptores endocrinos alteraba la producción de ERO intracelular, esta vez añadiendo PIC a los tratamientos. Se observó que solo las células INS-1E presentaron un aumento en la producción de ERO al exponerse al tratamiento con PIC, tanto en el vehículo como en la mezcla 1 μM (Figura 11B). Tanto en las células EndoC-βH1 como en MIN6, se observó un ligero descenso no significativo en la producción de ERO provocado por la mezcla 1 μM, independiente de la presencia de PIC (Figura 11A y C).

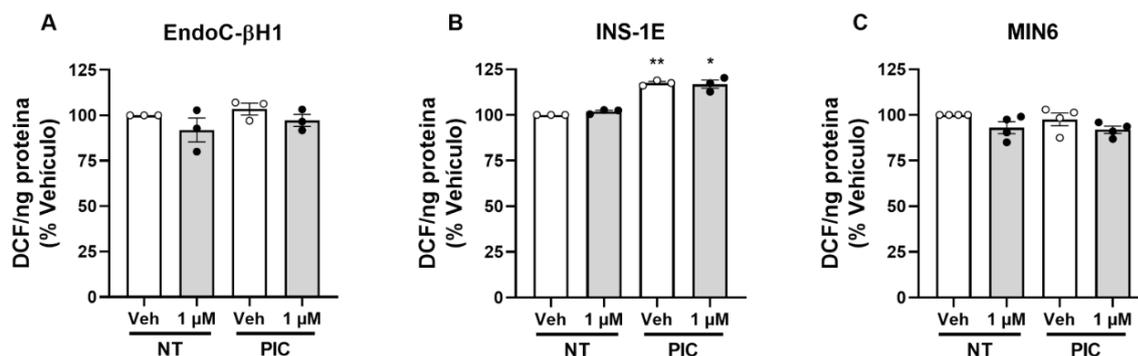


Figura 11. Análisis de la producción de ERO en las células EndoC-βH1, INS-1E y MIN6 tras la exposición a la mezcla de disruptores endocrinos y/o PIC. Las células EndoC-βH1 (A), INS-1E (B) y MIN6 (C) fueron tratadas durante 24 h con Vehículo (barras blancas) o la mezcla de disruptores endocrinos a 1 μM (barras grises) con y sin PIC. Se muestran los valores de fluorescencia de DCF normalizados por la cantidad de proteína, considerando como 100 % la condición control con vehículo sin PIC (Veh – NT). Los resultados son medias ± SEM de tres a cuatro experimentos independientes. *p≤0.05, **p≤0.01 vs su control sin PIC (NT), analizado mediante two-way ANOVA.

El PIC, pero no la mezcla de disruptores endocrinos, disminuyó la expresión de Bcl-xL y Bcl-2 en las células INS-1E.

Una vez más, con el objetivo de investigar parte del mecanismo de apoptosis, se evaluó en un experimento preliminar si el tratamiento con PIC junto a la mezcla de disruptores endocrinos ejercía algún efecto sobre la expresión de las proteínas Bcl-xL y Bcl-2. Tras 24 horas de tratamiento, se observó una disminución de la expresión de ambas proteínas en los tratamientos con PIC (Figura 12).

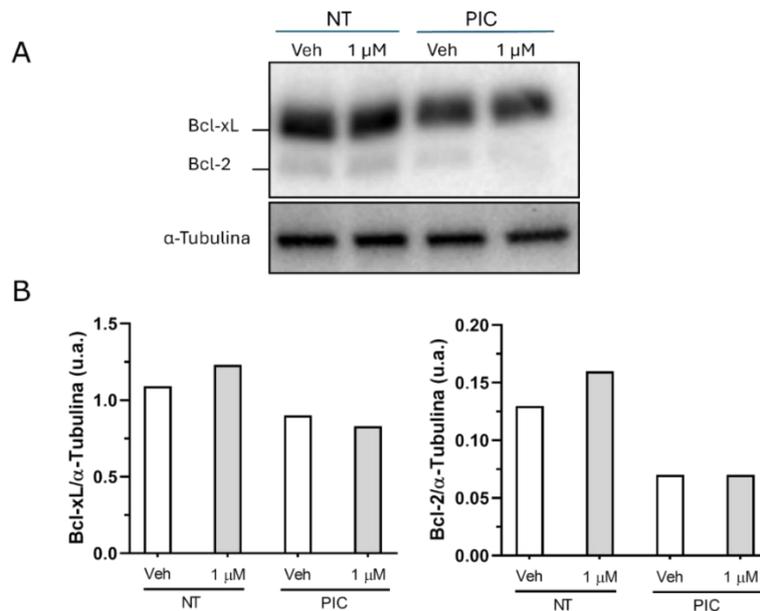


Figura 12. Análisis de la expresión de Bcl-xL y Bcl-2 en las células INS-1E tras la exposición a la mezcla de disruptores endocrinos y/o PIC. Las células INS-1E fueron tratadas durante 24 h con Vehículo (barras blancas) o la mezcla de disruptores endocrinos a 1 μM (barras grises) con y sin PIC. En (A) se muestran imágenes representativas de Bcl-xL, Bcl-2 y α-Tubulina. En (B) se muestran los valores de densitometría obtenidos para Bcl-xL y Bcl-2. Los valores se normalizaron por α-Tubulina. El resultado es el valor de un experimento.

El PIC junto a la mezcla de disruptores endocrinos aumentó la expresión de *Bip*, *Chop* y *Xbp1s*.

Debido a que el estrés de RE es un elemento común en los procesos de apoptosis en células β (Brozzi & Eizirik, 2016; Sahin et al., 2021), se decidió estudiar si la mezcla de disruptores endocrinos, así como el PIC, eran capaces de alterar la expresión de genes relacionados con

la respuesta al estrés de RE. Para eso, se midió la expresión de: *Bip* (*Binding-immunoglobulin protein*, también conocida como *Hspa5*, *heat shock protein family A member 5*), que codifica una chaperona que se encuentra en el lumen del RE actuando como represora de la respuesta a proteínas desplegadas; *Chop* (*CCAAT-enhancer-binding proteins homologous protein*, también conocida como *Ddit3*, *DNA-damage inducible transcript 3*), que codifica un factor de transcripción proapoptótico con un papel importante en la apoptosis inducida por estrés de RE; y *Xbp1s* (*X-box binding protein 1 spliced*), que codifica un factor que forma parte de la respuesta al estrés de RE (Sahin et al., 2021). El gen *Gapdh*, que codifica la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fue utilizado como gen de referencia.

Respecto a la expresión génica de *Bip*, se observó que, en las células INS-1E, los tratamientos empleando únicamente la mezcla de disruptores endocrinos o el PIC no alteraron la expresión de este gen. No obstante, al combinarlos sí se pudo apreciar un pequeño aumento en la expresión de *Bip* (Figura 13B).

En cuanto a la expresión de *Chop*, se observó cómo el PIC, tanto solo como combinándolo con la mezcla de disruptores endocrinos, fue capaz de aumentar sus niveles de ARN. En las células tratadas con vehículo, la expresión de *Chop* fue 6,9 veces mayor que en aquellas tratadas con PIC. En cambio, en las células que fueron tratadas con la mezcla de disruptores, la expresión de *Chop* fue 16,8 veces mayor en las que también fueron tratadas con PIC, en comparación con las que no lo recibieron (Figura 13C).

Finalmente, la expresión de *Xbp1s* mostró un comportamiento similar al observado en *Bip*: se produjo un aumento en la expresión génica de 7,6 veces en las células tratadas con la mezcla de disruptores y PIC respecto a las que solo fueron expuestas a la mezcla. Este incremento no se observó en ninguna de las demás condiciones (Figura 13A).

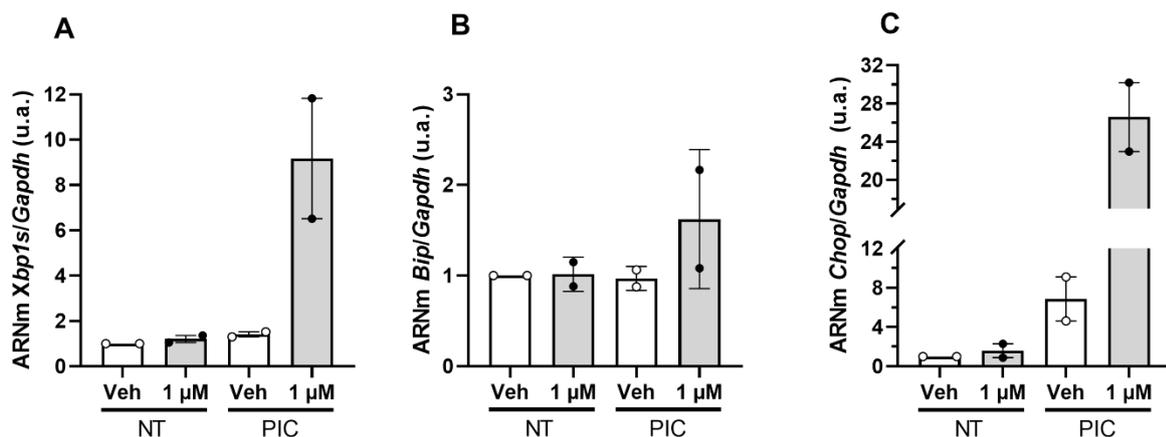


Figura 13. Análisis de la expresión de *Bip*, *Chop* y *Xbp1s* en las células INS-1E tras la exposición a la mezcla de disruptores endocrinos y/o PIC. Las células INS-1E fueron tratadas durante 24 horas con Vehículo (barras blancas) o la mezcla de disruptores endocrinos a 1 μ M (barras grises) con y sin PIC. Se muestran la expresión relativa de *Xbp1s* (A), *Bip* (B) y *Chop* (C), normalizada frente a *Gapdh*. Los valores obtenidos en las condiciones tratadas con vehículo sin PIC (Veh – NT) se establecieron como referencia (valor = 1). Los resultados son medias \pm SD de dos experimentos independientes.

El pretratamiento con la mezcla de disruptores endocrinos no potenció el efecto del PIC sobre la apoptosis en células β

Los disruptores endocrinos son ubicuos en el medio ambiente y estamos expuestos a ellos, de forma involuntaria, prácticamente desde el momento en que nacemos. Por esta razón se investigó los posibles efectos de una exposición a disruptores endocrinos previa a la infección viral. Para ello, se realizó un pretratamiento de 24 horas con vehículo o con la mezcla de disruptores 1 μ M. Posteriormente, las células fueron tratadas o no con PIC, en ausencia o presencia de la mezcla de disruptores 1 μ M, durante otras 24 horas. En esta situación, se observaron aumentos significativos en la muerte celular causados por el PIC tanto en las células INS-1E como MIN6 (Figura 14A y B).

En las células INS-1E se obtuvieron unos valores de apoptosis similares en los tratamientos sin PIC: 5,6 % para el vehículo y 6,6 % para la mezcla de disruptores. Por otro lado, el PIC provocó un aumento de la apoptosis cercano a 3 veces tanto en las células tratadas con el vehículo (2,8 veces) como con la mezcla de disruptores endocrinos (2,9 veces) (Figura 14A). Curiosamente, en las células MIN6, aunque la mezcla de disruptores endocrinos por sí sola indujo un aumento de la apoptosis de 2 veces, no se observó un incremento adicional al combinarla PIC (Figura 14B).

Adicionalmente, se calculó el "índice de apoptosis" para ambas líneas celulares con el objetivo de valorar si la mezcla de disruptores y el PIC producen efectos aditivos o sinérgicos sobre la apoptosis (Figura 14C y D). En la línea celular INS-1E se observó un ligero aumento en el índice de apoptosis, aunque no significativo, en las células tratadas con la mezcla de disruptores endocrinos (Figura 14C). Nuevamente, y siguiendo con lo visto en la Figura 10F, en las células MIN6 observamos un descenso significativo de este índice en aquellas tratadas con la mezcla (Figura 14D).

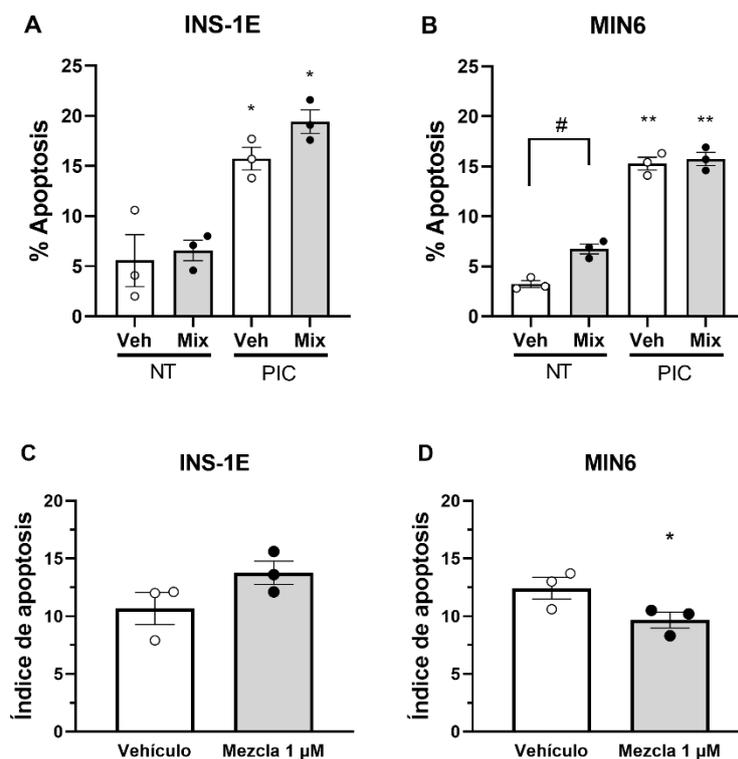


Figura 14. Análisis de la viabilidad celular en las células INS-1E y MIN6 tras el pretratamiento con la mezcla de disruptores endocrinos y la posterior exposición a dicha mezcla y/o PIC. Las células INS-1E (A y C) y MIN6 (B y D) fueron pretratadas durante 24 h con Vehículo o la mezcla de disruptores endocrinos a 1 μM. Posteriormente, las células fueron tratadas durante 24 h con Vehículo (barras blancas) o la mezcla de disruptores endocrinos a 1 μM (barras grises) con y sin PIC. (A y B) Se muestran los valores de apoptosis en %. (C y D) Se muestran los índices de apoptosis. Los resultados son medias ± SEM de tres experimentos independientes. (A y B): * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs su control sin PIC (NT); # $p \leq 0.05$ vs su vehículo, analizado mediante two-way ANOVA. (C y D): * $p \leq 0.05$ vs el vehículo, analizado mediante t-test pareado.

Ni la mezcla de disruptores endocrinos ni el PIC alteraron la secreción de insulina inducida estimulada por glucosa

Además de estudiar el efecto de la mezcla de disruptores endocrinos y el PIC sobre la viabilidad celular, otro de los objetivos era estudiar su efecto sobre la funcionalidad de las células β . Dado que la secreción de insulina constituye la principal función de las células β , se realizaron ensayos de secreción de insulina estimulada por glucosa en la línea celular MIN6, empleando dos concentraciones de glucosa: una no estimuladora (baja glucosa, 1,67 mM G) y otra capaz de estimular la secreción de insulina (alta glucosa, 16,7 mM G).

A concentraciones de glucosa no estimuladora se obtuvieron valores de secreción de insulina cercanos a los 50 ng de insulina/mg de proteína en todas las condiciones experimentales. No se observaron diferencias entre las diferentes condiciones experimentales, independientemente de haber tratado las células, o no, con la mezcla de disruptores endocrinos y/o PIC. En condiciones de alta glucosa se observó como aumentó la secreción

de insulina en todos los tratamientos cerca de 2 veces respecto al mismo tratamiento en condiciones de baja glucosa. Sin embargo, este aumento no fue significativo en ninguno de los tratamientos realizados (Figura 15).

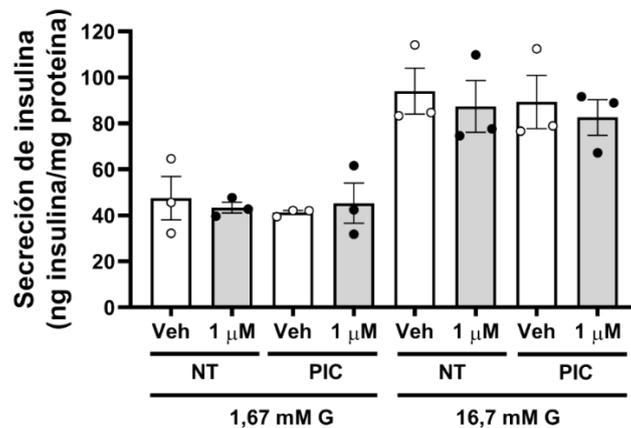


Figura 15. Análisis de la secreción de insulina en las células MIN6 tras la exposición a la mezcla de disruptores endocrinos y/o PIC. Las células MIN6 fueron tratadas durante 24 horas con Vehículo (barras blancas) o la mezcla de disruptores endocrinos a 1 μ M (barras grises) con y sin PIC. La secreción de insulina se evaluó a 1,67 y 16,7 mM de glucosa, y la insulina liberada al medio se cuantificó mediante ELISA. Los resultados son medias \pm SEM de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

En este proyecto se ha estudiado el efecto de una mezcla de disruptores endocrinos sobre la función y viabilidad de células β pancreáticas expuestas a un mimético de infecciones virales como es el PIC.

Una crítica habitual a los estudios sobre la exposición a disruptores endocrinos en células β es que no suelen analizar mezclas complejas, sino compuestos individuales (Howard, 2019; Predieri et al., 2020). Cabe destacar, que hay pocos estudios que hayan testado el efecto de mezclas de disruptores endocrinos en células β . Además, los pocos estudios publicados emplearon una mezcla de bifenilos policlorados conocida como Aroclor 1254 (Fang et al., 2020; Hoyeck et al., 2022; Xi et al., 2019; Zhang et al., 2015). Una exposición crónica a Aroclor 1254 altera la señalización insulínica en hígado y músculo, induciendo resistencia a la insulina e hiperglucemia en ratones macho (Zhang et al., 2015). La exposición repetida a esta mezcla provoca disfunción irreversible de las células β , mediante hipermetilación del promotor de *Ins2*, pasando de resistencia a la insulina a DT2 (Xi et al., 2019). Adicionalmente, Aroclor 1254 produce apoptosis en las células pancreáticas y origina proliferación compensatoria en células β , pero no en α (Fang et al., 2020). Como crítica, aunque el Aroclor 1254 sea una mezcla, está compuesta por la misma clase de químicos (es decir, bifenilos policlorados) y aún no representa las mezclas complejas a las que los humanos están expuestos. Asimismo, algo para tener en cuenta es que las concentraciones utilizadas en los estudios con disruptores endocrinos en células β , sean con compuestos individuales o con

Aroclor 1254, suelen ser mucho más altas que las observadas en humanos. Por este motivo, la primera tarea que se realizó fue determinar la concentración más adecuada de la mezcla de disruptores endocrinos para realizar los ensayos y que los datos obtenidos tuvieran relevancia medioambiental. Tomando como referencia datos previos del grupo de investigación y de otros (Al-Abdulla et al., 2022; Dos Santos et al., 2022, 2023), se emplearon dos concentraciones: 1 nM y 1 μ M, situadas en un rango de concentraciones seleccionado mediante estudios de biomonitorización de cada compuesto presente en la mezcla (Göckener et al., 2020; Henríquez-Hernández et al., 2021; Tschersich et al., 2021; Vandenberg et al., 2010). Los resultados de ambas líneas celulares, EndoC- β H1 e INS-1E, muestran como las dos concentraciones de la mezcla son capaces de aumentar la apoptosis (Figura 7). Esto puede deberse a que uno de los componentes de la mezcla utilizada es el BPA, un disruptor endocrino ampliamente estudiado del que se han demostrado sus efectos sobre la viabilidad celular. Se ha demostrado que desde concentraciones en el rango picomolar, el BPA fue capaz de inducir la apoptosis/reducir la viabilidad tanto en diferentes líneas celulares (INS-1E, MIN6 y EndoC- β H1) como en células dispersadas de islotes de ratón (Carchia et al., 2015; Daian et al., 2023; Dos Santos et al., 2022; Lin et al., 2013). El DEHP es otro compuesto de la mezcla que, por sí solo, fue capaz de disminuir la viabilidad de células MIN6 e inducir la apoptosis en células INS-1 tras el tratamiento con concentraciones $>10 \mu$ M (Al-Abdulla et al., 2022; Li et al., 2021; She et al., 2017; Sun et al., 2015). Con respecto al PFOA, este compuesto solo indujo apoptosis en células INS-1E y EndoC- β H1 a concentraciones entre 20 y 200 μ M, lo que representa dosis 20 a 200 veces más altas que las usadas en este trabajo (Dos Santos et al., 2022). Por fin, otros compuestos presentes en la mezcla, como el TCS y DDE, no cambiaron la viabilidad de los distintos modelos de células β a las concentraciones testadas (Dos Santos et al., 2022), aunque se ha observado que la exposición a TCS a partir de 17 μ M indujo necrosis en células MIN6 (Ajao et al., 2015).

Nuestro siguiente paso fue evaluar la generación de ERO, una vez que se ha demostrado que el aumento del estrés oxidativo puede causar la muerte de las células β (Evans et al., 2003). Además, se ha observado que diversos disruptores endocrinos, como el insecticida clorpirifos y el PFOS, inducen la producción de ERO en células de neuroblastoma o hepatocitos (Dai et al., 2015; Han et al., 2018; Park et al., 2017). Sin embargo, en nuestros modelos de células β , ninguna de las dos concentraciones de la mezcla testadas, 1 nM y 1 μ M, fue capaz de aumentar la producción de ERO (Figura 8). Esto podría deberse a que algunos compuestos de la mezcla ejercen efectos diferenciados sobre la generación de ERO. Por ejemplo, diversos estudios han demostrado que la exposición tanto a BPA como a DEHP incrementa la producción de ERO en células β . En el caso del BPA, se ha descrito que concentraciones entre 1 nM y 100 μ M inducen un aumento en la producción de ERO (Anastasiou et al., 2022; Carchia et al., 2015; Dos Santos et al., 2022; Xin et al., 2014). En

contraste, para el DEHP se requieren concentraciones superiores a 25 μM para observar efectos significativos (Li et al., 2021; She et al., 2017; Sun et al., 2015). Por otro lado, otros compuestos presentes en la mezcla, como el PFOA, el TCS y el DDE, no modificaron la generación de ERO por las células β en las concentraciones testadas en este trabajo ((Dos Santos et al., 2022) y datos no publicados de nuestro grupo).

Una vez se decidió utilizar la concentración 1 μM , se quiso estudiar si la mezcla era capaz de alterar la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL (Figura 9). La familia de proteínas Bcl-2 contiene miembros tanto proapoptóticos como antiapoptóticos, son reguladores de la supervivencia de las células, y sus interacciones juegan un papel crucial en la apoptosis mediada por las mitocondrias (Gurzov & Eizirik, 2011). No se observaron cambios en ninguna de las dos proteínas al tratar las células INS-1E durante 24 horas con la mezcla (Figura 9A y B), o al realizar tratamientos a varios tiempos en EndoC- βH1 (Figura 9C y D). Sin embargo, estudios con BPA, muestran una disminución de la expresión del RNA de *Bcl2* junto a un aumento en la expresión del RNA de *Bax* en células INS-1 e islotes de ratón (Carchia et al., 2015; Lin et al., 2013). Además, células RIN-m5F, frente a la exposición a arsénico durante 24 horas, también disminuyeron su expresión de Bcl-2, mientras que la de Bax permaneció inalterada (Lu et al., 2011). Esta disminución de Bcl-2 no concuerda con nuestros datos, y esta discrepancia puede deberse a que uno de los componentes interfiera con el BPA o al efecto de la mezcla per se. Uno de los siguientes pasos en la investigación podría ser estudiar el efecto de la mezcla sobre miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax o Bad.

A continuación, para simular los efectos de una infección viral sobre las células β , se utilizó PIC, un análogo de ARNdc, junto a la mezcla de disruptores endocrinos. De acuerdo con estudios previos en diferentes modelos de células β (Baden et al., 2015; Colli et al., 2011; Dos Santos et al., 2019; Marroqui et al., 2015), el tratamiento con PIC indujo apoptosis en las tres líneas celulares usadas en este trabajo. Asimismo, confirmamos que la mezcla de disruptores incrementó la apoptosis en las líneas celulares EndoC- βH1 e INS-1E, y también la indujo en las células MIN6 (Figura 10). En las células EndoC- βH1 e INS-1E, el mayor nivel de apoptosis se observó en aquellas tratadas con la combinación mezcla + PIC. El análisis del índice de apoptosis en estas células sugiere que la mezcla de disruptores y el PIC podrían activar diferentes vías de apoptosis, lo que explicaría su efecto aditivo. En contraste, las células MIN6 mostraron un nivel similar de apoptosis inducida por PIC, independientemente de la presencia de la mezcla. En este caso, el índice de apoptosis más bajo en la condición con la mezcla de disruptores sugiere una posible atenuación de los efectos apoptóticos del ARNdc cuando actúa de manera conjunta con la mezcla (Figura 10). Es importante tener en cuenta que, para obtener unos resultados más representativos, sería necesario infectar las células con CVBs, ya que la infección viral desencadena respuestas más complejas que las

inducidas por el tratamiento con PIC. Este constituye uno de los siguientes pasos en la presente línea de investigación.

Del mismo modo que en los ensayos presentados en la Figura 8, se midieron las posibles alteraciones en la producción de ERO tras el tratamiento de las células con la mezcla de disruptores endocrinos, en esta ocasión en combinación con PIC. En este caso, únicamente se observó un aumento en la producción de ERO en las células INS-1E tratadas con PIC, tanto en la condición vehículo como en la tratada con la mezcla de disruptores endocrinos (Figura 11). Según nuestro conocimiento, no se han publicado estudios del efecto del PIC sobre la producción de ERO en células β , pero en otros tipos celulares sí. En células bronquiales epiteliales humanas no se observaron cambios en la producción de ERO tras un tratamiento con PIC 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 horas (Chu et al., 2023). En células HeLa tampoco se observaron cambios después de 40 horas de exposición a PIC 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Meng et al., 2022). Estos resultados sugieren que el estrés oxidativo no tendría un papel predominante en la inducción de apoptosis tras el tratamiento con la mezcla o su combinación con PIC, aunque no puede descartarse que contribuya de manera secundaria o en interacción con otras vías. Para seguir estudiando parte del mecanismo de apoptosis, se realizó un experimento preliminar en que se quiso comprobar si la mezcla + PIC ejercía algún efecto en la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL (Figura 12). Contrariamente a lo visto en la Figura 9, en la que no se vieron cambios, se observa en las células INS-1E que, al ser expuestas a la mezcla, ambas proteínas aumentan ligeramente su expresión respecto al vehículo; mientras que con PIC, ambas proteínas sufren una reducción de su expresión en las dos condiciones (vehículo + PIC y mezcla + PIC). Estos resultados coinciden parcialmente con otras investigaciones, en las que tratamientos solamente con BPA disminuyeron la expresión de Bcl-2 (Carchia et al., 2015; Lin et al., 2013), observándolo nosotros en la mezcla + PIC. Colli y colaboradores reportaron un descenso de la expresión de las proteínas antiapoptóticas Mcl-1 y Bcl-xL, pero no de Bcl-2 tras la exposición de células INS-1E a PIC (Colli et al., 2011). Adicionalmente, otro estudio concluyó que un estrés leve de RE predispone a las células β a los efectos proapoptóticos de la citoquina IL-1 β , al desequilibrar el ratio entre proteínas Bcl-2 pro y antiapoptóticas (Miani et al., 2013). La respuesta inflamatoria que desencadene el PIC (Dogusan et al., 2008), así como el estrés de RE causado por compuestos de la mezcla, podrían estar actuando de forma conjunta dando lugar al descenso en la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL. Por tanto, un siguiente paso en la investigación sería estudiar cómo afectan estos tratamientos a la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia de Bcl-2, así como la evaluación en las líneas EndoC- β H1 y MIN6.

Finalmente, se evaluó la expresión de *Bip*, *Chop* y *Xbp1s*, tres genes marcadores del estrés de RE en células β (Brozzi & Eizirik, 2016; Sahin et al., 2021), tras el tratamiento con la mezcla de disruptores endocrinos y con PIC en células INS-1E (Figura 13). En las células tratadas

con la combinación de la mezcla de disruptores endocrinos + PIC, se observó una respuesta similar en los genes *Bip* y *Xbp1s*: únicamente estas células mostraron alteraciones en la expresión de dichos genes, siendo más pronunciada en el caso de *Xbp1s*. En cuanto al gen *Chop*, todas las células tratadas con PIC, ya sea con vehículo o con la mezcla de disruptores endocrinos, mostraron un aumento en su expresión, siendo más elevado en las células expuestas a la combinación de la mezcla y PIC. Un estudio en la línea de células β pancreáticas humanas 1.1B4 con dos metabolitos de compuestos de la mezcla, el MEHP (metabolito del DEHP) y el MBP (metabolito del BPA), encontró que estos provocaron un aumento del estrés de RE asociado a las proteínas Chop y NF- κ B (Yöntem et al., 2024). Otro estudio en células INS-1 reportó que la exposición a DEHP (25-625 μ M) durante 24 horas aumentó la transcripción y traducción de chaperonas del RE como Bip y GRP94, así como provocó la activación de la vía PERK-ATF4-CHOP. En células β de rata, el PIC indujo la expresión de *Xbp1s*, *Atf4*, *Chop* y *Bip* (Dogusan 2008). Este aumento en la expresión de *Xbp1s*, *Bip* y *Chop* coincide con lo observado en nuestros experimentos, aunque, curiosamente el tratamiento en que se observó consistía únicamente en PIC, mientras que el nuestro fue en PIC + la mezcla, pudiendo sugerir que la respuesta de las células ante la mezcla se vea aumentada por la acción del PIC. Otro estudio ha reportado que la infección por CVB en células β activó la vía IRE1 α /XBP1s/JNK1 que contribuye a la replicación viral y bloqueó la vía proapoptótica PERK/ATF4/CHOP, favoreciendo así que el virus siga infectando otras células (Colli et al., 2019). Estos resultados sugieren que la combinación de la mezcla y PIC puede inducir vías de estrés de RE que, si se mantienen de manera prolongada, podrían desembocar en la apoptosis de las células β (Brozzi & Eizirik, 2016; Sahin et al., 2021). Estos datos provienen de dos experimentos, por lo que sería necesario realizar más experimentos independientes para confirmar con confianza estadística que los cambios observados son significativos y no simplemente tendencias. Además, sería importante evaluar la expresión de estos genes en las líneas EndoC- β H1 y MIN6.

Dado que es probable que cualquier persona haya estado previamente expuesta a disruptores endocrinos antes de la infección viral que pueda desencadenar la DT1, se decidió exponer las células durante 24 horas a la mezcla de disruptores endocrinos antes de tratarlas con la combinación de la mezcla + PIC, con el objetivo de simular una situación de exposición “crónica” (Figura 14). De manera similar a los resultados observados tras un tratamiento de 24 h (Figura 10), en la línea celular INS-1E se observó un aumento de la apoptosis en las células tratadas con PIC, tanto con vehículo como con la mezcla. En las células MIN6, en cambio, la apoptosis aumentó únicamente con la mezcla de disruptores endocrinos o con el PIC por separado, pero no con la combinación de la mezcla + PIC. Estos resultados sugieren que una exposición prolongada a la mezcla de disruptores endocrinos no modifica sus efectos sobre la viabilidad celular, tanto en presencia como en ausencia de PIC.

Además de los efectos sobre la viabilidad celular, otro de los objetivos del trabajo era estudiar cómo se veía afectada la función de las células β al exponerse a la mezcla de disruptores endocrinos en combinación con PIC. En las células MIN6 no se han encontrado diferencias entre los tratamientos ni entre las diferentes condiciones de glucosa (Figura 15). Otros estudios han demostrado que los disruptores endocrinos, de manera individual, producen efectos variables sobre la secreción de insulina en respuesta a estímulos glucémicos en distintos modelos de células β . Dado que el BPA es posiblemente el disruptor endocrino más estudiado, existen numerosos trabajos sobre sus efectos en la secreción de insulina. De manera general, se ha demostrado que el tratamiento con dosis bajas de BPA (hasta 1 μM) induce un aumento en la secreción de insulina estimulada por glucosa (Al-Abdulla et al., 2022; Alonso-Magdalena et al., 2006; Marroqui, Martínez-Pinna, et al., 2021; Villar-Pazos et al., 2017). En cuanto al PFOA, se observó que este compuesto disminuyó la secreción de insulina estimulada por glucosa a concentraciones entre 10 pM a 100 nM, pero no a 1 μM , en la línea celular EndoC- βH1 (Dos Santos et al., 2022). Sin embargo, un estudio previo demostró que concentraciones más altas de PFOA, superiores a 10 μM , aumentaron la secreción de insulina en la línea de células $\beta\text{-TC-6}$ derivadas de ratón (Qin et al., 2020). La exposición a DDE (1-10 μM) incrementó la secreción de insulina tanto en células EndoC- βH1 (Dos Santos et al., 2022) como en $\beta\text{-TC-6}$ (Ward et al., 2021). Por otro lado, la exposición a DEHP mostró efectos negativos sobre la función de las células β , incluyendo una disminución dosis-dependiente de la secreción de insulina en células INS-1 y MIN6 (Al-Abdulla et al., 2022; Li et al., 2021; Sun et al., 2015). Por último, el único disruptor endocrino de la mezcla que no ha mostrado ningún efecto sobre la secreción de insulina fue el TCS (Dos Santos et al., 2022). En conjunto, al igual que se ha observado en la producción de ERO, es posible que los efectos de los distintos disruptores endocrinos se compensen entre sí y, como resultado final, no se observen cambios significativos en la secreción de insulina.

Habiendo discutido los resultados, a continuación, comentaremos las limitaciones que presenta el estudio: la mayoría de los experimentos se realizaron con tiempos de exposición de 24 horas; sin embargo, es posible que la mezcla produzca efectos más tardíos que no se estén detectando. Del mismo modo, los medios de cultivo empleados contienen componentes, como el FBS y el rojo de fenol, que se ha demostrado pueden enmascarar los efectos de compuestos estrogénicos como el BPA. Para evitar estas interferencias, suele utilizarse un medio sin rojo de fenol y con FBS *charcoal-stripped* (del que se han eliminado las hormonas esteroides), el cual se ha demostrado que no interfiere en los efectos del BPA (Babiloni-Chust et al., 2022). En cuanto a las limitaciones, fue necesario dejar de utilizar la línea celular humana EndoC- βH1 y sustituirla por la línea murina MIN6 a partir del bloque de experimentos de ERO en células tratadas con la mezcla + PIC, debido a contratiempos técnicos imprevistos. Finalmente, cabe señalar que algunos resultados experimentales no

son estadísticamente sólidos, ya que corresponden a experimentos preliminares (Figura 12) o bien no fue posible realizar más réplicas por causas externas (Figura 13). En cualquier caso, estos constituyen pasos previstos para la continuación de la investigación.

CONCLUSIONES

A modo de conclusiones del presente trabajo se pueden establecer:

- La mezcla de disruptores endocrinos indujo la apoptosis de células β , pero sin provocar alteraciones en la producción de ERO intracelular, la expresión de Bcl-2/Bcl-xL y tampoco en la secreción de insulina estimulada por glucosa.
- El tratamiento con PIC aumentó la apoptosis y el estrés oxidativo, aunque solo en las células INS-1E, activó marcadores de estrés de RE y redujo la expresión de proteínas antiapoptóticas.
- La exposición conjunta de la mezcla de disruptores y PIC no potenció la apoptosis más que el efecto del PIC individualmente, pero sí aumentó la expresión de genes de estrés de RE (*Bip*, *Chop* y *Xbp1s*)
- Los resultados sugieren que la mezcla de disruptores compromete la viabilidad de las células β y que, en presencia de una infección viral, aumentarían su vulnerabilidad mediante la activación de vías intracelulares de estrés.
- Una falta de efectos sinérgicos sobre la apoptosis indica que la interacción que ocurre entre los disruptores endocrinos y las infecciones virales es compleja y requeriría de estudios con modelos más cercanos a la fisiología humana.
- Los datos obtenidos apoyan la hipótesis de que la exposición a contaminantes ambientales podría constituir un potencial factor de riesgo para el desarrollo de DT1.

BIBLIOGRAFÍA

- Ajao, C., Andersson, M. A., Teplova, V. V., Nagy, S., Gahmberg, C. G., Andersson, L. C., Hautaniemi, M., Kakasi, B., Roivainen, M., & Salkinoja-Salonen, M. (2015). Mitochondrial toxicity of triclosan on mammalian cells. *Toxicology Reports*, 2, 624-637. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.03.012>
- Akirav, E., Kushner, J. A., & Herold, K. C. (2008). β -Cell Mass and Type 1 Diabetes: Going, Going, Gone? *Diabetes*, 57(11), 2883-2888. <https://doi.org/10.2337/db07-1817>
- Al-Abdulla, R., Ferrero, H., Soriano, S., Boronat-Belda, T., & Alonso-Magdalena, P. (2022). Screening of Relevant Metabolism-Disrupting Chemicals on Pancreatic β -Cells: Evaluation of Murine and Human In Vitro Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4182. <https://doi.org/10.3390/ijms23084182>
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), 732-738. <https://doi.org/10.1038/35099560>
- Ali, M. M. U., Bagratuni, T., Davenport, E. L., Nowak, P. R., Silva-Santisteban, M. C., Hardcastle, A., McAndrews, C., Rowlands, M. G., Morgan, G. J., Aherne, W., Collins, I., Davies, F. E., & Pearl, L. H. (2011). Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *The EMBO Journal*, 30(5), 894-905. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.18>
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 106-112. <https://doi.org/10.1289/ehp.8451>
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Carrera, M. P., Cederroth, C. R., Baquié, M., Gauthier, B. R., Nef, S., Stefani, E., & Nadal, A. (2008). Pancreatic Insulin Content Regulation by the Estrogen Receptor ER α . *PLOS ONE*, 3(4), e2069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002069>
- Anastasiou, I. A., Eleftheriadou, I., Tentolouris, A., Sarantis, P., Angelopoulou, A., Katsaouni, A., Mourouzis, I., Karamouzis, M. V., Gorgoulis, V., Pantos, C., & Tentolouris, N. (2022). Low concentrations of bisphenol A promote the activation of the mitochondrial apoptotic pathway on Beta-TC-6 cells via the generation of intracellular reactive oxygen species and mitochondrial superoxide. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(8), e23099. <https://doi.org/10.1002/jbt.23099>
- Babiloni-Chust, I., dos Santos, R. S., Medina-Gali, R. M., Perez-Serna, A. A., Encinar, J.-A., Martinez-Pinna, J., Gustafsson, J.-A., Marroqui, L., & Nadal, A. (2022). G protein-coupled estrogen receptor activation by bisphenol-A disrupts the protection from apoptosis conferred by the estrogen receptors ER α and ER β in pancreatic beta cells. *Environment International*, 164, 107250. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107250>
- Baden, M. Y., Fukui, K., Hosokawa, Y., Iwahashi, H., Imagawa, A., & Shimomura, I. (2015). Examination of a Viral Infection Mimetic Model in Human iPS Cell-Derived Insulin-Producing Cells and the Anti-Apoptotic Effect of GLP-1 Analogue. *PloS One*, 10(12), e0144606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144606>
- Baggen, J., Thibaut, H. J., Strating, J. R. P. M., & van Kuppeveld, F. J. M. (2018). The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature Reviews Microbiology*, 16(6), 368-381. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0005-4>
- Batterham, R. L., Le Roux, C. W., Cohen, M. A., Park, A. J., Ellis, S. M., Patterson, M., Frost, G. S., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. (2003). Pancreatic Polypeptide Reduces Appetite and Food Intake in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(8), 3989-3992. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030630>
- Beard, J. (2006). DDT and human health. *Science of The Total Environment*, 355(1), 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.02.022>
- Bodin, J., Bølling, A. K., Samuelson, M., Becher, R., Løvik, M., & Nygaard, U. C. (2013). Long-term bisphenol A exposure accelerates insulinitis development in diabetes-prone NOD

- mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 35(3), 349-358. <https://doi.org/10.3109/08923973.2013.772195>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brand, M. D. (2016). Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>
- Bresson, S. E., Isom, S., Jensen, E. T., Huber, S., Oulhote, Y., Rigdon, J., Lovato, J., Liese, A. D., Pihoker, C., Dabelea, D., Ehrlich, S., & Ruzzin, J. (2022). Associations between persistent organic pollutants and type 1 diabetes in youth. *Environment International*, 163, 107175. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107175>
- Brozzi, F., & Eizirik, D. L. (2016). ER stress and the decline and fall of pancreatic beta cells in type 1 diabetes. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 121(2), 133-139. <https://doi.org/10.3109/03009734.2015.1135217>
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P.-O., & Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2334-2339. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510790103>
- Carchia, E., Porreca, I., Almeida, P. J., D'Angelo, F., Cuomo, D., Ceccarelli, M., De Felice, M., Mallardo, M., & Ambrosino, C. (2015). Evaluation of low doses BPA-induced perturbation of glycemia by toxicogenomics points to a primary role of pancreatic islets and to the mechanism of toxicity. *Cell Death & Disease*, 6(10), e1959-e1959. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.319>
- Carré, A., Vecchio, F., Flodström-Tullberg, M., You, S., & Mallone, R. (2023). Coxsackievirus and Type 1 Diabetes: Diabetogenic Mechanisms and Implications for Prevention. *Endocrine Reviews*, 44(4), 737-751. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnad007>
- Cetkovic-Cvrlje, M., Olson, M., Schindler, B., & Gong, H. K. (2016). Exposure to DDT metabolite p,p'-DDE increases autoimmune type 1 diabetes incidence in NOD mouse model. *Journal of Immunotoxicology*, 13(1), 108-118. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2015.1017060>
- Chu, G. E., Park, J. Y., Park, C. H., & Cho, W. G. (2023). Mitochondrial Reactive Oxygen Species in TRIF-Dependent Toll-like Receptor 3 Signaling in Bronchial Epithelial Cells against Viral Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 226. <https://doi.org/10.3390/ijms25010226>
- Colli, M. L., Nogueira, T. C., Allagnat, F., Cunha, D. A., Gurzov, E. N., Cardozo, A. K., Roivainen, M., Op de beek, A., & Eizirik, D. L. (2011). Exposure to the Viral By-Product dsRNA or Coxsackievirus B5 Triggers Pancreatic Beta Cell Apoptosis via a Bim / Mcl-1 Imbalance. *PLoS Pathogens*, 7(9), e1002267. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002267>
- Colli, M. L., Paula, F. M., Marselli, L., Marchetti, P., Roivainen, M., Eizirik, D. L., & Op de beek, A. (2019). Coxsackievirus B Tailors the Unfolded Protein Response to Favour Viral Amplification in Pancreatic β Cells. *Journal of Innate Immunity*, 11(4), 375-390. <https://doi.org/10.1159/000496034>
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49-63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- Dagar, M., Kumari, P., Mirza, A. M. W., Singh, S., Ain, N. U., Munir, Z., Javed, T., Virk, M. F. I., Javed, S., Qizilbash, F. H., Kc, A., Ekhatior, C., & Bellegarde, S. B. (2023). The Hidden Threat: Endocrine Disruptors and Their Impact on Insulin Resistance. *Cureus*, 15(10), e47282. <https://doi.org/10.7759/cureus.47282>
- Dai, H., Deng, Y., Zhang, J., Han, H., Zhao, M., Li, Y., Zhang, C., Tian, J., Bing, G., & Zhao, L. (2015). PINK1/Parkin-mediated mitophagy alleviates chlorpyrifos-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicology*, 334, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.06.003>

- Daian, L. M., Tanko, G., Vacaru, A. M., Ghila, L., Chera, S., & Vacaru, A.-M. (2023). Modulation of Unfolded Protein Response Restores Survival and Function of β -Cells Exposed to the Endocrine Disruptor Bisphenol A. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24032023>
- DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 391(10138), 2449-2462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31320-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5)
- Dogusan, Z., García, M., Flamez, D., Alexopoulou, L., Goldman, M., Gysemans, C., Mathieu, C., Libert, C., Eizirik, D. L., & Rasschaert, J. (2008). Double-Stranded RNA Induces Pancreatic β -Cell Apoptosis by Activation of the Toll-Like Receptor 3 and Interferon Regulatory Factor 3 Pathways. *Diabetes*, 57(5), 1236-1245. <https://doi.org/10.2337/db07-0844>
- 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>
- Dominguez Gutierrez, G., Kim, J., Lee, A.-H., Tong, J., Niu, J., Gray, S. M., Wei, Y., Ding, Y., Ni, M., Adler, C., Murphy, A. J., Gromada, J., & Xin, Y. (2018). Gene Signature of the Human Pancreatic ϵ Cell. *Endocrinology*, 159(12), 4023-4032. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00833>
- Dos Santos, R. S., Babiloni-Chust, I., Marroqui, L., & Nadal, A. (2023). Screening of Metabolism-Disrupting Chemicals on Pancreatic α -Cells Using In Vitro Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijms24010231>
- Dos Santos, R. S., Marroqui, L., Velayos, T., Olazagoitia-Garmendia, A., Jauregi-Miguel, A., Castellanos-Rubio, A., Eizirik, D. L., Castaño, L., & Santin, I. (2019). DEXI, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates rat and human pancreatic beta cell inflammation via regulation of the type I IFN/STAT signalling pathway. *Diabetologia*, 62(3), 459-472. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4782-0>
- Dos Santos, R. S., Medina-Gali, R. M., Babiloni-Chust, I., Marroqui, L., & Nadal, A. (2022). In Vitro Assays to Identify Metabolism-Disrupting Chemicals with Diabetogenic Activity in a Human Pancreatic β -Cell Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms23095040>
- Earls, A. O., Axford, I. P., & Braybrook, J. H. (2003). Gas chromatography–mass spectrometry determination of the migration of phthalate plasticisers from polyvinyl chloride toys and childcare articles. *Journal of Chromatography A*, 983(1), 237-246. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01736-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01736-3)
- Eguchi, N., Vaziri, N. D., Dafoe, D. C., & Ichii, H. (2021). The Role of Oxidative Stress in Pancreatic β Cell Dysfunction in Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1509. <https://doi.org/10.3390/ijms22041509>
- Eno, C. O., Eckenrode, E. F., Olberding, K. E., Zhao, G., White, C., & Li, C. (2012). Distinct roles of mitochondria- and ER-localized Bcl-xL in apoptosis resistance and Ca²⁺ homeostasis. *Molecular Biology of the Cell*, 23(13), 2605-2618. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-02-0090>
- Escribano-Lopez, I., Bañuls, C., Diaz-Morales, N., Iannantuoni, F., Rovira-Llopis, S., Gomis, R., Rocha, M., Hernandez-Mijares, A., Murphy, M. P., & Victor, V. M. (2019). The Mitochondria-Targeted Antioxidant MitoQ Modulates Mitochondrial Function and Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic β Cells Exposed to Hyperglycaemia | Cell Physiol Biochem. *Cellular Physiology & Biochemistry*, 52(2), 186-197. <https://www.cellphysiolbiochem.com/Articles/000013/>
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2003). Are Oxidative Stress–Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction? *Diabetes*, 52(1), 1-8. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.1>
- Fang, L., Zhang, S., Ou, K., Zuo, Z., Yu, A., & Wang, C. (2020). Exposure to Aroclor 1254 differentially affects the survival of pancreatic β -cells and α -cells in the male mice and the potential reason. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 188, 109875. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109875>

- Frank, J. A., Broichhagen, J., Yushchenko, D. A., Trauner, D., Schultz, C., & Hodson, D. J. (2018). Optical tools for understanding the complexity of β -cell signalling and insulin release. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(12), 721-737. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0105-2>
- Göckener, B., Weber, T., Rüdell, H., Bücking, M., & Kolossa-Gehring, M. (2020). Human biomonitoring of per- and polyfluoroalkyl substances in German blood plasma samples from 1982 to 2019. *Environment International*, 145, 106123. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106123>
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., & Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), E1-E150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>
- Gurzov, E. N., & Eizirik, D. L. (2011). Bcl-2 proteins in diabetes: Mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction. *Trends in Cell Biology*, 21(7), 424-431. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.03.001>
- Han, R., Hu, M., Zhong, Q., Wan, C., Liu, L., Li, F., Zhang, F., & Ding, W. (2018). Perfluorooctane sulphonate induces oxidative hepatic damage via mitochondria-dependent and NF- κ B/TNF- α -mediated pathway. *Chemosphere*, 191, 1056-1064. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.070>
- He, X., Wu, D., Xu, Y., Zhang, Y., Sun, Y., Chang, X., Zhu, Y., & Tang, W. (2022). Perfluorooctanoic acid promotes pancreatic β cell dysfunction and apoptosis through ER stress and the ATF4/CHOP/TRIB3 pathway. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(56), 84532-84545. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21188-9>
- Heindel, J. J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M. A., Nadal, A., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., Vandenberg, L. N., & vom Saal, F. (2017). Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reproductive Toxicology*, 68, 3-33. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.10.001>
- Henríquez-Hernández, L. A., Ortiz-Andrelluchi, A., Álvarez-Pérez, J., Acosta-Dacal, A., Zumbado, M., Martínez-González, M. A., Boada, L. D., Salas-Salvadó, J., Luzardo, O. P., & Serra-Majem, L. (2021). Human biomonitoring of persistent organic pollutants in elderly people from the Canary Islands (Spain): A temporal trend analysis from the PREDIMED and PREDIMED-Plus cohorts. *Science of The Total Environment*, 758, 143637. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143637>
- Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(8), 421-438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- Hinault, C., Caroli-Bosc, P., Bost, F., & Chevalier, N. (2023). Critical Overview on Endocrine Disruptors in Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4537. <https://doi.org/10.3390/ijms24054537>
- Hodik, M., Skog, O., Lukinius, A., Isaza-Correa, J. M., Kuipers, J., Giepmans, B. N. G., & Frisk, G. (2016). Enterovirus infection of human islets of Langerhans affects β -cell function resulting in disintegrated islets, decreased glucose stimulated insulin secretion and loss of Golgi structure. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 4(1). <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2015-000179>
- Howard, S. G. (2019). Exposure to environmental chemicals and type 1 diabetes: An update. *J Epidemiol Community Health*, 73(6), 483-488. <https://doi.org/10.1136/jech-2018-210627>
- Hoyeck, M. P., Matteo, G., MacFarlane, E. M., Perera, I., & Bruin, J. E. (2022). Persistent organic pollutants and β -cell toxicity: A comprehensive review. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 322(5), E383-E413. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00358.2021>
- Ilonen, J., Lempainen, J., & Veijola, R. (2019). The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(11), 635-650. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0254-y>

- International Diabetes Federation. (2025). *IDF Diabetes Atlas 11th edition*. IDF Diabetes Atlas 2025. <https://diabetesatlas.org/resources/idf-diabetes-atlas-2025/>
- InvivoGen. (2016, noviembre 25). *Poly(I:C) HMW | Synthetic dsRNA*. InvivoGen. <https://www.invivogen.com/polyic-hmw-tlr3-agonist>
- Ionescu-Tirgoviste, C., Gagniuc, P. A., Gubceac, E., Mardare, L., Popescu, I., Dima, S., & Militaru, M. (2015). A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Scientific Reports*, 5(1), 14634. <https://doi.org/10.1038/srep14634>
- Isaacs, S. R., Foskett, D. B., Maxwell, A. J., Ward, E. J., Faulkner, C. L., Luo, J. Y. X., Rawlinson, W. D., Craig, M. E., & Kim, K. W. (2021). Viruses and Type 1 Diabetes: From Enteroviruses to the Virome. *Microorganisms*, 9(7), 1519. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071519>
- Isaacs, S. R., Roy, A., Dance, B., Ward, E. J., Foskett, D. B., Maxwell, A. J., Rawlinson, W. D., Kim, K. W., & Craig, M. E. (2023). Enteroviruses and risk of islet autoimmunity or type 1 diabetes: Systematic review and meta-analysis of controlled observational studies detecting viral nucleic acids and proteins. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 11(8), 578-592. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(23\)00122-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(23)00122-5)
- Jensen, S., & Thomsen, A. R. (2012). Sensing of RNA Viruses: A Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion. *Journal of Virology*, 86(6), 2900-2910. <https://doi.org/10.1128/jvi.05738-11>
- Johnston, N. R., Mitchell, R. K., Haythorne, E., Pessoa, M. P., Semplici, F., Ferrer, J., Piemonti, L., Marchetti, P., Bugliani, M., Bosco, D., Berishvili, E., Duncanson, P., Watkinson, M., Broichhagen, J., Trauner, D., Rutter, G. A., & Hodson, D. J. (2016). Beta Cell Hubs Dictate Pancreatic Islet Responses to Glucose. *Cell Metabolism*, 24(3), 389-401. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.020>
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.-S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), 101-105. <https://doi.org/10.1038/nature04734>
- Kawai, T., & Akira, S. (2008). Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143(1), 1-20. <https://doi.org/10.1196/annals.1443.020>
- Kerkvliet, N. I., Stepan, L. B., Vorachek, W., Oda, S., Farrer, D., Wong, C. P., Pham, D., & Mourich, D. V. (2009). Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor by Tcdd Prevents Diabetes in Nod Mice and Increases Foxp3+ T Cells in Pancreatic Lymph Nodes. *Immunotherapy*, 1(4), 539-547. <https://doi.org/10.2217/imt.09.24>
- Keskesiadou, G.-N., Tsokkou, S., Konstantinidis, I., Georgaki, M.-N., Sioga, A., Papamitsou, T., & Karachrysafti, S. (2024). Endocrine-Disrupting Chemicals and the Development of Diabetes Mellitus Type 1: A 5-Year Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(18), 10111. <https://doi.org/10.3390/ijms251810111>
- Koniecki, D., Wang, R., Moody, R. P., & Zhu, J. (2011). Phthalates in cosmetic and personal care products: Concentrations and possible dermal exposure. *Environmental Research*, 111(3), 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.01.013>
- 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. (2014). 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>
- Kuiper, J., Moran, M., & Cetkovic-Cvrlje, M. (2016). Exposure to polychlorinated biphenyl-153 decreases incidence of autoimmune Type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Journal of Immunotoxicology*, 13(6), 850-860. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2016.1213333>
- La Merrill, M. A., Smith, M. T., McHale, C. M., Heindel, J. J., Atlas, E., Cave, M. C., Collier, D., Guyton, K. Z., Koliwad, S., Nadal, A., Rhodes, C. J., Sargis, R. M., Zeise, L., &

- Blumberg, B. (2024). Consensus on the key characteristics of metabolism disruptors. *Nature Reviews Endocrinology*, 1-17. <https://doi.org/10.1038/s41574-024-01059-8>
- La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., Guyton, K. Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V. J., Woodruff, T. J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K. S., Gore, A. C., Zeise, L., & Zoeller, R. T. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(1), 45-57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- Laiho, J. E., Oikarinen, S., Morfopoulou, S., Oikarinen, M., Renner, A., Depledge, D., Ross, M. C., Gerling, I. C., Breuer, J., Petrosino, J. F., Plagnol, V., Pugliese, A., Toniolo, A., Lloyd, R. E., Hyöty, H., & for the nPOD-Virus Group. (2025). Detection of enterovirus RNA in pancreas and lymphoid tissues of organ donors with type 1 diabetes. *Diabetologia*, 68(6), 1211-1225. <https://doi.org/10.1007/s00125-025-06359-w>
- Lee, D.-H., & Jr, D. R. J. (2019). New approaches to cope with possible harms of low-dose environmental chemicals. *J Epidemiol Community Health*, 73(3), 193-197. <https://doi.org/10.1136/jech-2018-210920>
- Lee, Y.-M., Ha, C.-M., Kim, S.-A., Thoudam, T., Yoon, Y.-R., Kim, D.-J., Kim, H.-C., Moon, H.-B., Park, S., Lee, I.-K., & Lee, D.-H. (2017). Low-Dose Persistent Organic Pollutants Impair Insulin Secretory Function of Pancreatic β -Cells: Human and In Vitro Evidence. *Diabetes*, 66(10), 2669-2680. <https://doi.org/10.2337/db17-0188>
- Leenders, F., Groen, N., de Graaf, N., Engelse, M. A., Rabelink, T. J., de Koning, E. J. P., & Carlotti, F. (2021). Oxidative Stress Leads to β -Cell Dysfunction Through Loss of β -Cell Identity. *Frontiers in Immunology*, 12, 690379. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.690379>
- Lema, C., Varela-Ramirez, A., & Aguilera, R. J. (2011). Differential nuclear staining assay for high-throughput screening to identify cytotoxic compounds. *Current cellular biochemistry*, 1(1), 1-14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4816492/>
- Li, L., Wang, F., Zhang, J., Wang, K., De, X., Li, L., & Zhang, Y. (2021). Typical phthalic acid esters induce apoptosis by regulating the PI3K/Akt/Bcl-2 signaling pathway in rat insulinoma cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111461. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111461>
- Lin, Y., Sun, X., Qiu, L., Wei, J., Huang, Q., Fang, C., Ye, T., Kang, M., Shen, H., & Dong, S. (2013). Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death & Disease*, 4(1), e460. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.206>
- Liu, D., Pavlovic, D., Chen, M. C., Flodström, M., Sandler, S., & Eizirik, D. L. (2000). Cytokines induce apoptosis in beta-cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS^{-/-}). *Diabetes*, 49(7), 1116-1122. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.7.1116>
- Lloyd, R. E., Tamhankar, M., & Lernmark, Å. (2022). Enteroviruses and Type 1 Diabetes: Multiple Mechanisms and Factors? *Annual Review of Medicine*, 73(Volume 73, 2022), 483-499. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042320-015952>
- Longnecker, D. S., & Thompson, E. D. (2023). Anatomy, Histology, and Fine Structure of the Pancreas. En *The Pancreas* (pp. 9-22). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119876007.ch2>
- Loo, Y.-M., & Gale, M. (2011). Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity*, 34(5), 680-692. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003>
- Lu, T.-H., Su, C.-C., Chen, Y.-W., Yang, C.-Y., Wu, C.-C., Hung, D.-Z., Chen, C.-H., Cheng, P.-W., Liu, S.-H., & Huang, C.-F. (2011). Arsenic induces pancreatic β -cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways. *Toxicology Letters*, 201(1), 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.11.019>
- Luijten, M., Vlaanderen, J., Kortenkamp, A., Antignac, J.-P., Barouki, R., Bil, W., van den Brand, A., den Braver-Sewradj, S., van Klaveren, J., Mengelers, M., Ottenbros, I., Rantakokko, P., Kolossa-Gehring, M., & Lebret, E. (2023). Mixture risk assessment

- and human biomonitoring: Lessons learnt from HBM4EU. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 249, 114135. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2023.114135>
- Marciniak, S. J., Garcia-Bonilla, L., Hu, J., Harding, H. P., & Ron, D. (2006). Activation-dependent substrate recruitment by the eukaryotic translation initiation factor 2 kinase PERK. *Journal of Cell Biology*, 172(2), 201-209. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508099>
- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H. P., & Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & Development*, 18(24), 3066-3077. <https://doi.org/10.1101/gad.1250704>
- Marjomäki, V., & Flodström-Tullberg, M. (2022). Coxsackie B virus. *Trends in Microbiology*, 30(6), 606-607. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.01.016>
- Marroqui, L., Dos Santos, R. S., Fløyel, T., Grieco, F. A., Santin, I., Op de beeck, 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., Martínez-Pinna, J., Castellano-Muñoz, M., Dos Santos, R. S., Medina-Gali, R. M., Soriano, S., Quesada, I., Gustafsson, J.-A., Encinar, J. A., & Nadal, A. (2021). Bisphenol-S and Bisphenol-F alter mouse pancreatic β -cell ion channel expression and activity and insulin release through an estrogen receptor ER β mediated pathway. *Chemosphere*, 265, 129051. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129051>
- Marroqui, L., Perez-Serna, A. A., Babiloni-Chust, I., & Dos Santos, R. S. (2021). Chapter One—Type I interferons as key players in pancreatic β -cell dysfunction in type 1 diabetes. En I. Santin & L. Galluzzi (Eds.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 359, pp. 1-80). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.02.011>
- Martínez-Pinna, J., Sempere-Navarro, R., Medina-Gali, R. M., Fuentes, E., Quesada, I., Sargis, R. M., Trasande, L., & Nadal, A. (2023). Endocrine disruptors in plastics alter β -cell physiology and increase the risk of diabetes mellitus. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 324(6), E488-E505. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00068.2023>
- Meng, X., Cui, X., Shao, X., Liu, Y., Xing, Y., Smith, V., Xiong, S., Macip, S., & Chen, Y. (2022). Poly(I:C) synergizes with proteasome inhibitors to induce apoptosis in cervical cancer cells. *Translational Oncology*, 18, 101362. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101362>
- Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C. B., & Maechler, P. (2004). Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology*, 145(2), 667-678. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1099>
- Miani, M., Barthson, J., Colli, M. L., Brozzi, F., Cnop, M., & Eizirik, D. L. (2013). Endoplasmic reticulum stress sensitizes pancreatic beta cells to interleukin-1 β -induced apoptosis via Bim/A1 imbalance. *Cell Death & Disease*, 4(7), e701. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.236>
- 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>
- Nadal, A., Quesada, I., Tudurí, E., Nogueiras, R., & Alonso-Magdalena, P. (2017). Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(9), 536-546. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.51>
- Nekoua, M. P., Alidjinou, E. K., & Hober, D. (2022). Persistent coxsackievirus B infection and pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(8), 503-516. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00688-1>

- Noguchi, G. M., & Huising, M. O. (2019). Integrating the inputs that shape pancreatic islet hormone release. *Nature Metabolism*, 1(12), 1189-1201. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0148-2>
- Nyalwidhe, J. O., Jurczyk, A., Satish, B., Redick, S., Qaisar, N., Trombly, M. I., Vangala, P., Racicot, R., Bortell, R., Harlan, D. M., Greiner, D. L., Brehm, M. A., Nadler, J. L., & Wang, J. P. (2020). Proteomic and Transcriptional Profiles of Human Stem Cell-Derived β Cells Following Enteroviral Challenge. *Microorganisms*, 8(2), 295. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020295>
- Ogle, G. D., Wang, F., Haynes, A., Gregory, G. A., King, T. W., Deng, K., Dabelea, D., James, S., Jenkins, A. J., Li, X., Ma, R. C. W., Maahs, D. M., Oram, R. A., Pihoker, C., Svensson, J., Zhou, Z., Magliano, D. J., & Maniam, J. (2025). Global type 1 diabetes prevalence, incidence, and mortality estimates 2025: Results from the International diabetes Federation Atlas, 11th Edition, and the T1D Index Version 3.0. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 225. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2025.112277>
- Op de Beeck, A., & Eizirik, D. L. (2016). Viral infections in type 1 diabetes mellitus—Why the β cells? *Nature Reviews Endocrinology*, 12(5), 263-273. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.30>
- Ortis, F., Cardozo, A. K., Crispim, D., Störling, J., Mandrup-Poulsen, T., & Eizirik, D. L. (2006). Cytokine-Induced Proapoptotic Gene Expression in Insulin-Producing Cells Is Related to Rapid, Sustained, and Nonoscillatory Nuclear Factor- κ B Activation. *Molecular Endocrinology*, 20(8), 1867-1879. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0268>
- Oshima, M., Knoch, K.-P., Diedisheim, M., Petzold, A., Cattan, P., Bugliani, M., Marchetti, P., Choudhary, P., Huang, G.-C., Bornstein, S. R., Solimena, M., Albagli-Curiel, O., & Scharfmann, R. (2018). Virus-like infection induces human β cell dedifferentiation. *JCI Insight*, 3(3), e97732, 97732. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97732>
- Panjwani, A., Strauss, M., Gold, S., Wenham, H., Jackson, T., Chou, J. J., Rowlands, D. J., Stonehouse, N. J., Hogle, J. M., & Tuthill, T. J. (2014). Capsid Protein VP4 of Human Rhinovirus Induces Membrane Permeability by the Formation of a Size-Selective Multimeric Pore. *PLoS Pathogens*, 10(8), e1004294. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004294>
- Papalou, O., Kandaraki, E. A., Papadakis, G., & Diamanti-Kandaraki, E. (2019). Endocrine Disrupting Chemicals: An Occult Mediator of Metabolic Disease. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 112. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00112>
- Park, J. H., Ko, J., Park, Y. S., Park, J., Hwang, J., & Koh, H. C. (2017). Clearance of Damaged Mitochondria Through PINK1 Stabilization by JNK and ERK MAPK Signaling in Chlorpyrifos-Treated Neuroblastoma Cells. *Molecular Neurobiology*, 54(3), 1844-1857. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9753-1>
- Perez-Serna, A. A., Guzman-Llorens, D., Dos Santos, R. S., & Marroqui, L. (2025). Bcl-2 and Bcl-xL in Diabetes: Contributions to Endocrine Pancreas Viability and Function. *Biomedicines*, 13(1), 223. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13010223>
- Pociot, F. (2017). Type 1 diabetes genome-wide association studies: Not to be lost in translation. *Clinical & Translational Immunology*, 6(12), e162. <https://doi.org/10.1038/cti.2017.51>
- Popgeorgiev, N., Jabbour, L., & Gillet, G. (2018). Subcellular Localization and Dynamics of the Bcl-2 Family of Proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00013>
- Predieri, B., Bruzzi, P., Bigi, E., Ciancia, S., Madeo, S. F., Lucaccioni, L., & Iughetti, L. (2020). Endocrine Disrupting Chemicals and Type 1 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2937. <https://doi.org/10.3390/ijms21082937>
- Qin, W.-P., Cao, L.-Y., Li, C.-H., Guo, L.-H., Colbourne, J., & Ren, X.-M. (2020). Perfluoroalkyl Substances Stimulate Insulin Secretion by Islet β Cells via G Protein-Coupled Receptor 40. *Environmental Science & Technology*, 54(6), 3428-3436. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07295>
- Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., & Scharfmann, R. (2011). A genetically engineered human pancreatic β cell line

- exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(9), 3589-3597. <https://doi.org/10.1172/JCI58447>
- Redondo, M. J., Onengut-Gumuscu, S., & Gaulton, K. J. (2023). Genetics of Type 1 Diabetes. En J. M. Lawrence, S. S. Casagrande, W. H. Herman, D. J. Wexler, & W. T. Cefalu (Eds.), *Diabetes in America*. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK597411/>
- Refolo, G., Vescovo, T., Piacentini, M., Fimia, G. M., & Ciccocanti, F. (2020). Mitochondrial Interactome: A Focus on Antiviral Signaling Pathways. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00008>
- Rewers, M., & Ludvigsson, J. (2016). Environmental risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet*, 387(10035), 2340-2348. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30507-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30507-4)
- Ribeiro, E., Ladeira, C., & Viegas, S. (2017). EDCs Mixtures: A Stealthy Hazard for Human Health? *Toxics*, 5(1), 5. <https://doi.org/10.3390/toxics5010005>
- Richardson, S. J., Morgan, N. G., & Foulis, A. K. (2014). Pancreatic Pathology in Type 1 Diabetes Mellitus. *Endocrine Pathology*, 25(1), 80-92. <https://doi.org/10.1007/s12022-014-9297-8>
- Richardson, S. J., Rodriguez-Calvo, T., Laiho, J. E., Kaddis, J. S., Nyalwidhe, J. O., Kusmartseva, I., Morfopoulou, S., Petrosino, J. F., Plagnol, V., Maedler, K., Morris, M. A., Nadler, J. L., Atkinson, M. A., von Herrath, M., Lloyd, R. E., Hyoty, H., Morgan, N. G., Pugliese, A., & for the nPOD-Virus Group. (2025). Joint analysis of the nPOD-Virus Group data: The association of enterovirus with type 1 diabetes is supported by multiple markers of infection in pancreas tissue. *Diabetologia*, 68(6), 1226-1241. <https://doi.org/10.1007/s00125-025-06401-x>
- Rodriguez-Calvo, T., Laiho, J. E., Oikarinen, M., Akhbari, P., Flaxman, C., Worthington, T., Apaolaza, P., Kaddis, J. S., Kusmartseva, I., Tauriainen, S., Campbell-Thompson, M., Atkinson, M. A., von Herrath, M., Hyoty, H., Morgan, N. G., Pugliese, A., Richardson, S. J., & for the nPOD-Virus group. (2025). Enterovirus VP1 protein and HLA class I hyperexpression in pancreatic islet cells of organ donors with type 1 diabetes. *Diabetologia*, 68(6), 1197-1210. <https://doi.org/10.1007/s00125-025-06384-9>
- Roivainen, M., Rasilainen, S., Ylipaasto, P., Nissinen, R., Ustinov, J., Bouwens, L., Eizirik, D. L., Hovi, T., & Otonkoski, T. (2000). Mechanisms of Coxsackievirus-Induced Damage to Human Pancreatic β -Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(1), 432-440. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.1.6306>
- Rorsman, P., & Ashcroft, F. M. (2018). Pancreatic β -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. *Physiological Reviews*, 98(1), 117-214. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2017>
- Rorsman, P., & Huisin, M. O. (2018). The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(7), 404-414. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0020-6>
- Rutter, G. A., & Hodson, D. J. (2013). Minireview: Intra-islet Regulation of Insulin Secretion in Humans. *Molecular Endocrinology*, 27(12), 1984-1995. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1278>
- Sahin, G. S., Lee, H., & Engin, F. (2021). An accomplice more than a mere victim: The impact of β -cell ER stress on type 1 diabetes pathogenesis. *Molecular Metabolism*, 54, 101365. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101365>
- Salo, H. M., Koponen, J., Kiviranta, H., Rantakokko, P., Honkanen, J., Härkönen, T., Ilonen, J., Virtanen, S. M., Tillmann, V., Knip, M., Vaarala, O., & the DIABIMMUNE Study Group. (2019). No evidence of the role of early chemical exposure in the development of β -cell autoimmunity. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(2), 1370-1378. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3659-6>
- Santin, I., Dos Santos, R. S., & Eizirik, D. L. (2016). Pancreatic Beta Cell Survival and Signaling Pathways: Effects of Type 1 Diabetes-Associated Genetic Variants. En K. M. Gillespie (Ed.), *Type-1 Diabetes: Methods and Protocols* (pp. 21-54). Springer New York. https://doi.org/10.1007/7651_2015_291

- Scarim, A. L., Arnush, M., Blair, L. A., Concepcion, J., Heitmeier, M. R., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Ryerse, J., Buller, R. M., & Corbett, J. A. (2001). Mechanisms of β -Cell Death in Response to Double-Stranded (ds) RNA and Interferon- γ : dsRNA-Dependent Protein Kinase Apoptosis and Nitric Oxide-Dependent Necrosis. *The American Journal of Pathology*, *159*(1), 273-283. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61693-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61693-8)
- She, Y., Jiang, L., Zheng, L., Zuo, H., Chen, M., Sun, X., Li, Q., Geng, C., Yang, G., Jiang, L., & Liu, X. (2017). The role of oxidative stress in DNA damage in pancreatic β cells induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Chemico-Biological Interactions*, *265*, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.01.015>
- Sioofy-Khojine, A.-B., Richardson, S. J., Locke, J. M., Oikarinen, S., Nurminen, N., Laine, A.-P., Downes, K., Lempainen, J., Todd, J. A., Veijola, R., Ilonen, J., Knip, M., Morgan, N. G., Hyöty, H., Peakman, M., & Eichmann, M. (2022). Detection of enterovirus RNA in peripheral blood mononuclear cells correlates with the presence of the predisposing allele of the type 1 diabetes risk gene IFIH1 and with disease stage. *Diabetologia*, *65*(10), 1701-1709. <https://doi.org/10.1007/s00125-022-05753-y>
- Steiner, D. J., Kim, A., Miller, K., & Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*, *2*(3), 135-145. <https://doi.org/10.4161/isl.2.3.11815>
- Sun, X., Lin, Y., Huang, Q., Shi, J., Qiu, L., Kang, M., Chen, Y., Fang, C., Ye, T., & Dong, S. (2015). Di(2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS-1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *19*(3), 581-594. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12409>
- Supale, S., Li, N., Brun, T., & Maechler, P. (2012). Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *23*(9), 477-487. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.06.002>
- Tan, X., Sun, L., Chen, J., & Chen, Z. J. (2018). Detection of Microbial Infections Through Innate Immune Sensing of Nucleic Acids. *Annual Review of Microbiology*, *72*(Volume 72, 2018), 447-478. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095605>
- Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., & Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. *Journal of Cell Biology*, *217*(7), 2273-2289. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802095>
- Toren, E., Burnette, K. S., Banerjee, R. R., Hunter, C. S., & Tse, H. M. (2021). Partners in Crime: Beta-Cells and Autoimmune Responses Complicit in Type 1 Diabetes Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.756548>
- Tschersich, C., Murawski, A., Schwedler, G., Rucic, E., Moos, R. K., Kasper-Sonnenberg, M., Koch, H. M., Brüning, T., & Kolossa-Gehring, M. (2021). Bisphenol A and six other environmental phenols in urine of children and adolescents in Germany – human biomonitoring results of the German Environmental Survey 2014–2017 (GerES V). *Science of The Total Environment*, *763*, 144615. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144615>
- van der Schaar, H. M., Dorobantu, C. M., Albulescu, L., Strating, J. R. P. M., & van Kuppeveld, F. J. M. (2016). Fat(al) attraction: Picornaviruses Usurp Lipid Transfer at Membrane Contact Sites to Create Replication Organelles. *Trends in Microbiology*, *24*(7), 535-546. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.017>
- Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F. J. R., & Schoenfelder, G. (2010). Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, *118*(8), 1055-1070. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>
- Vecchio, F., Carré, A., Korenkov, D., Zhou, Z., Apaolaza, P., Tuomela, S., Burgos-Morales, O., Snowwhite, I., Perez-Hernandez, J., Brandao, B., Afonso, G., Halliez, C., Kaddis, J., Kent, S. C., Nakayama, M., Richardson, S. J., Vinh, J., Verdier, Y., Laiho, J., ... Mallone, R. (2024). Coxsackievirus infection induces direct pancreatic β cell killing but poor antiviral CD8+ T cell responses. *Science Advances*, *10*(10), ead1122. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ad1122>

- Vehik, K., Lynch, K. F., Wong, M. C., Tian, X., Ross, M. C., Gibbs, R. A., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Rewers, M., Toppari, J., Ziegler, A. G., She, J.-X., Lernmark, A., Akolkar, B., Hagopian, W. A., Schatz, D. A., Krischer, J. P., Hyöty, H., & Lloyd, R. E. (2019). Prospective virome analyses in young children at increased genetic risk for type 1 diabetes. *Nature Medicine*, *25*(12), 1865-1872. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0667-0>
- Veronese-Paniagua, D. A., Hernandez-Rincon, D. C., Taylor, J. P., Tse, H. M., & Millman, J. R. (2024). *Coxsackievirus B infection invokes unique cell-type specific responses in primary human pancreatic islets* (p. 2024.07.23.604861). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.07.23.604861>
- Villar-Pazos, S., Martinez-Pinna, J., Castellano-Muñoz, M., Alonso-Magdalena, P., Marroqui, L., Quesada, I., Gustafsson, J.-A., & Nadal, A. (2017). Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on ca²⁺ entry in mouse pancreatic β-cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 11770. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11995-3>
- Virtuoso, S., Raggi, C., Maugliani, A., Baldi, F., Gentili, D., & Narciso, L. (2024). Toxicological Effects of Naturally Occurring Endocrine Disruptors on Various Human Health Targets: A Rapid Review. *Toxics*, *12*(4), 256. <https://doi.org/10.3390/toxics12040256>
- Wang, K., Ye, F., Chen, Y., Xu, J., Zhao, Y., Wang, Y., & Lan, T. (2021). Association Between Enterovirus Infection and Type 1 Diabetes Risk: A Meta-Analysis of 38 Case-Control Studies. *Frontiers in Endocrinology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706964>
- Ward, A. B., Dail, M. B., & Chambers, J. E. (2021). In vitro effect of DDE exposure on the regulation of B-TC-6 pancreatic beta cell insulin secretion: A potential role in beta cell dysfunction and type 2 diabetes mellitus. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *31*(9), 667-673. <https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1950251>
- Warren, C. F. A., Wong-Brown, M. W., & Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death & Disease*, *10*(3), 177. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1407-6>
- Xi, Z., Fang, L., Xu, J., Li, B., Zuo, Z., Lv, L., & Wang, C. (2019). Exposure to Aroclor 1254 persistently suppresses the functions of pancreatic β-cells and deteriorates glucose homeostasis in male mice. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, *249*, 822-830. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.101>
- Xin, F., Jiang, L., Liu, X., Geng, C., Wang, W., Zhong, L., Yang, G., & Chen, M. (2014). Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *769*, 29-33. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.019>
- Ylipaasto, P., Smura, T., Gopalacharyulu, P., Paananen, A., Seppänen-Laakso, T., Kaijalainen, S., Ahlfors, H., Korsgren, O., Lakey, J. R. T., Lahesmaa, R., Piemonti, L., Oresic, M., Galama, J., & Roivainen, M. (2012). Enterovirus-induced gene expression profile is critical for human pancreatic islet destruction. *Diabetologia*, *55*(12), 3273-3283. <https://doi.org/10.1007/s00125-012-2713-z>
- Yöntem, F. D., Ayaz, S., Bulut, Ş., Aldoğan, E. H., & Ahbab, M. A. (2024). Endoplasmic reticulum stress and pro-inflammatory responses induced by phthalate metabolites monoethylhexyl phthalate and monobutyl phthalate in 1.1B4 pancreatic beta cells. *Toxicology*, *501*, 153695. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2023.153695>
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. *Cell*, *107*(7), 881-891. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00611-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00611-0)
- Zhang, S., Wu, T., Chen, M., Guo, Z., Yang, Z., Zuo, Z., & Wang, C. (2015). Chronic Exposure to Aroclor 1254 Disrupts Glucose Homeostasis in Male Mice via Inhibition of the Insulin Receptor Signal Pathway. *Environmental Science & Technology*, *49*(16), 10084-10092. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01597>