

Máster Universitario en Biotecnología y Bioingeniería
Trabajo Final de Máster 2024/2025

Evaluación de inhibidores de proteínas JAK en células mononucleares de sangre periférica para el tratamiento de la diabetes tipo 1

Sara Cortell Mera

Tutor: Dra. Laura Marroqui Esclapez
Co-tutor: Dr. Reinaldo Sousa Dos Santos

Grupo de investigación: Islet Biology Lab - UNIBAD

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 y **D. REINALDO SOUSA DOS SANTOS**, Investigador Miguel Servet, Hospital General Universitario de Elche/FISABIO.

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

“Evaluación de inhibidores de proteínas JAK en células mononucleares de sangre periférica para el tratamiento de la diabetes tipo 1”:

SARA CORTELL MERA

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

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

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

Abreviaturas

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

CCL2: Proteína quimioatrayente de monocitos 1.

CCL5: Ligando 5 de quimiocina del motivo CC.

CVB: Cocksackievirus B.

CXCL1: Ligando 1 de quimiocina del motivo CXC.

CXCL10: Ligando 10 de quimiocina con motivo CXC.

DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DT1: Diabetes tipo 1.

DT2: Diabetes tipo 2.

FBS: Suero fetal bovino.

GAD65: Glutamato descarboxilasa 65.

HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos.

IA2: Tirosín fosfatasa 2.

IL-21: Interleucina 21

IL-1 β : Interleucina 1 β .

IFN: Interferón.

IFNAR1/IFNAR2: Interferon Alpha and Beta Receptor Subunit 1/2.

IRF9: Interferon regulatory factor 9.

ISG: Genes estimulados por interferón.

ISGF3: Interferon-Stimulated Gene Factor 3.

JAK: Proteína Janus Quinasa (sigla en inglés).

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

MX1: Gen de resistencia a Mixovirus 1.

NOD: Non Obese Diabetic, ratones diabéticos no obesos.

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PBS: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RPMI: *Roswell Park Memorial Insitute Medium.*

STAT: Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción.

TGF- α : Factor de crecimiento transformante α .

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β .

TYK2: Proteína tirosina quinasa 2.

ZnT8: Transportador de Zinc 8.

Resumen

La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune crónica que se caracteriza por la destrucción específica de las células β pancreáticas por el sistema inmune. En personas genéticamente susceptibles, este diálogo culmina con la destrucción de las células β , lo que lleva a una insuficiencia en la secreción de insulina. Pese a ser una de las enfermedades autoinmunes más estudiadas, a día de hoy la DT1 no tiene cura, y las personas con esta enfermedad sólo pueden sobrevivir gracias a la administración de insulina de manera exógena. Por lo tanto, desarrollar terapias eficaces que puedan prevenir o retrasar el diagnóstico clínico de DT1 constituye una necesidad médica urgente. Una de las estrategias postuladas para prevenir la DT1 son los inhibidores de la ruta de señalización JAK-STAT, la cual media la señalización y la inflamación causada por IFNs. En este proyecto, se propone comparar la eficacia de baricitinib, un inhibidor de la cascada de la familia JAK que ya está en fases clínicas para el tratamiento de la DT1, con deucravacitinib, un inhibidor específico de TYK2. Para esta finalidad, hemos usado las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con DT1 e individuos sin DT1. Los resultados demuestran que las PBMCs constituyen un modelo *in vitro* válido para evaluar la eficacia de inhibidores de la señalización del IFN, destacando a *MX1* y *CXCL10* como biomarcadores robustos de respuesta terapéutica en el contexto de la DT1. Además, los resultados obtenidos refuerzan el valor de este enfoque para avanzar hacia estrategias de terapia personalizada, evidenciando diferencias en la eficacia de deucravacitinib y baricitinib según los parámetros analizados. En conjunto, estos hallazgos aportan una base sólida para el uso de PBMCs en la identificación de biomarcadores y en la optimización de terapias personalizadas para la DT1.

Palabras clave: DT1, inflamación, PBMCs, JAK, TYK2, IFN α , IFN γ , deucravacitinib, baricitinib.

Abstract

Type 1 diabetes (T1D) is a chronic autoimmune disease characterised by the specific destruction of pancreatic β cells by the immune system. In genetically susceptible individuals, this dialogue culminates in the destruction of β cells, leading to insufficient insulin secretion. Despite being one of the most studied autoimmune diseases, there is currently no cure for T1D, and people with this disease can only survive through exogenous insulin administration. Therefore, developing effective therapies that can prevent or delay clinical diagnosis of T1D is an urgent medical need. One of the strategies proposed to prevent T1D is the use of inhibitors of the JAK-STAT signalling pathway, which mediates signalling and inflammation caused by IFNs. In this project, we propose to compare the efficacy of baricitinib, a JAK family cascade inhibitor already in clinical trials for the treatment of T1D, with deucravacitinib, a specific TYK2 inhibitor. For this purpose, we used peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with T1D and individuals without T1D. The results demonstrate that PBMCs constitute a valid in vitro model for evaluating the efficacy of IFN signalling inhibitors, highlighting *MX1* and *CXCL10* as robust biomarkers of therapeutic response in the context of T1D. Furthermore, the results obtained reinforce the value of this approach for advancing towards personalised therapy strategies, highlighting differences in the efficacy of deucravacitinib and baricitinib according to the parameters analysed. Taken together, these findings provide a solid basis for the use of PBMCs in the identification of biomarkers and the optimisation of personalised therapies for T1D.

Keywords: T1D, inflammation, PBMCs, JAK, TYK2, IFN α , IFN γ , deucravacitinib, baricitinib.

Índice

Abreviaturas	2
Resumen	3
Abstract	4
1. Introducción	6
1.1. Etiología de la diabetes tipo 1.....	6
1.1.1. Etapas clínicas de la DT1.	8
1.2. Sistema inmune.....	10
1.3. Las vías del interferón y su importancia en la DT1.	15
1.4. Tratamientos para la DT1.....	17
1.4.1. Inmunoterapias e inmunomoduladores para el tratamiento de la DT1.	18
2. Antecedentes y objetivos.....	24
3. Materiales y métodos.....	26
3.1. Selección de los pacientes: criterios de inclusión y exclusión.....	26
3.2. Aislamiento y cultivo de PBMCs.	26
3.2.1. Aislamiento de PBMCs:	27
3.2.2. Protocolo de descongelación de PBMCs.	28
3.2.3. Cultivo y tratamiento de PBMCs.	28
3.3. Extracción de RNA.	29
3.4. Retrotranscripción.	30
3.5. PCR cuantitativa.....	31
3.6. Multiplex.	32
3.7. Análisis estadístico	32
4. Resultados.....	33
4.1. Selección de muestra poblacional.	33
4.2. Niveles de péptido C menores en pacientes con DT1 que en controles.	35
4.3. Deucravacitinib y Baricitinib disminuyen la expresión de ISGs en presencia de IFN α en PBMCs.	36
4.4. Efecto de los inhibidores Deucravacitinib y Baricitinib en la secreción de quimiocinas en PBMCs tras el tratamiento con IFN α	39
4.5. Deucravacitinib y Baricitinib disminuyen la expresión de ISGs en presencia de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica.	41
4.6. Efecto de los inhibidores Deucravacitinib y Baricitinib en la secreción de quimiocinas en PBMCs tras el tratamiento con IFN γ	44
6. Discusión	46
7. Conclusiones.....	52
8. Bibliografía.....	53

1. Introducción

1.1. Etiología de la diabetes tipo 1.

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por la incapacidad de mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de los parámetros normales, resultando en una hiperglicemia persistente. Esta alteración es resultado de una deficiencia en la secreción de insulina, en la acción de esta o en ambos procesos. Según los últimos censos realizados por la Federación Internacional de Diabetes actualmente hay unos 589 millones de pacientes con diabetes en el mundo, de los que 58 millones aproximadamente viven a diario con diabetes en Europa. Estas cifras alarmantes, se suman al hecho de que hay un incremento de entre el 1-2% de la incidencia de diabetes en Europa cada año (1–3).

Las dos formas de diabetes más comunes son la diabetes tipo 1 (DT1) y la diabetes tipo 2 (DT2). La DT2 resulta de una combinación entre la aparición de resistencia a la insulina y la disfunción y pérdida progresiva de las células β pancreáticas encargadas de producir insulina. La resistencia a la insulina ocurre en tejidos como el músculo, el hígado y el tejido adiposo. Si este problema se mantiene, las células β pancreáticas producen más insulina para compensar esta resistencia periférica. Este esfuerzo constante las sobrecarga y, con el tiempo, provoca la disfunción y pérdida de masa de células β (4,5).

En este proyecto nos hemos centrado en la DT1, una enfermedad autoinmune crónica en la que las células T autorreactivas destruyen específicamente las células β pancreáticas, resultando en poca o nula secreción de insulina endógena a sangre. La DT1 es una enfermedad que se puede desarrollar durante mucho tiempo, pudiendo aparecer a cualquier edad, aunque mayoritariamente se diagnostica en niños y jóvenes adultos. El debut clínico se da cuando el paciente ya suele haber perdido alrededor del 80% de la masa funcional de células β , aunque este porcentaje puede variar dependiendo de la edad o del grado de ataque del sistema inmune (6–8).

La DT1 representa alrededor del 5-10% de los casos de diabetes totales. La Federación Internacional de Diabetes estima que, actualmente, 9,2 millones de personas de todas las edades viven con DT1 en el mundo. De estos, unos 1,8 millones son menores de 20 años (9). En España, se estima que hay unas 190 mil personas con DT1, y, de manera bastante preocupante, la incidencia de DT1 está aumentando alrededor de 2,4% cada año. Así que cada año se diagnostican 6000 nuevos casos, de los cuáles entre 1200 y 1500 son en menores de 15 años (2,3,10).

En la actualidad, se considera que la DT1 surge de un diálogo aberrante entre las células β pancreáticas y el sistema inmune. La hipótesis más aceptada sostiene que, en individuos con una predisposición genética, una exposición a desencadenantes ambientales provoca una inflamación crónica de los islotes denominada insulitis. La insulitis, que sería entonces la manifestación del ataque autoinmune a los islotes pancreáticos, resulta de la pérdida de tolerancia inmunológica frente a estos y en la destrucción progresiva de las células β (6,11,12).

Hace ya casi 40 años cuando se postuló la secuencia de eventos que, hoy en día, sigue siendo el modelo más aceptado de cómo se desarrolla la DT1 (Figura 1). En individuos genéticamente predispuestos (es decir portadores de variantes alélicas en ciertos genes que confieren mayor o menor riesgo de desarrollar la enfermedad), una infección vírica, en edades tempranas desencadena una respuesta inmune inflamatoria de bajo grado, pero persistente, que lleva las células β pancreáticas a un estado de inflamación basal crónico (8,13). Aunque se han propuesto varios posibles agentes, de aquellos de los que se tiene más evidencias son los virus del género Enterovirus, en particular por el subtipo Coxsackievirus B (CVB) (9).

A raíz de esta respuesta inflamatoria crónica, las células β activan mecanismos de defensa antiviral como la síntesis y secreción de interferones (IFNs) tipo I, lo que lleva a una estimulación de la expresión de genes estimulados por IFNs (ISGs). Por un lado, la producción constante de IFNs tipo I por las células β lleva a la hiperexpresión de los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C, los cuales pertenecen al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I) y codifican proteínas de clase I, esenciales para la presentación de antígenos a las células T. Por otro lado, ocurre un aumento de la secreción de quimiocinas, responsables por la migración de células inmunes hacia el islote pancreático. El reclutamiento de células del sistema inmune al microambiente pancreático perpetúa la inflamación local en el tejido. Además, debido a la sobreexpresión de MHC-I, estas células no solo se infiltran en el islote pancreático, sino que también entran en contacto con autoantígenos de las células β presentados por MHC-I. Si este estado inflamatorio se mantiene a largo plazo, culmina con la destrucción de las células β pancreáticas del individuo y el diagnóstico clínico de la DT1 (9,11,12).

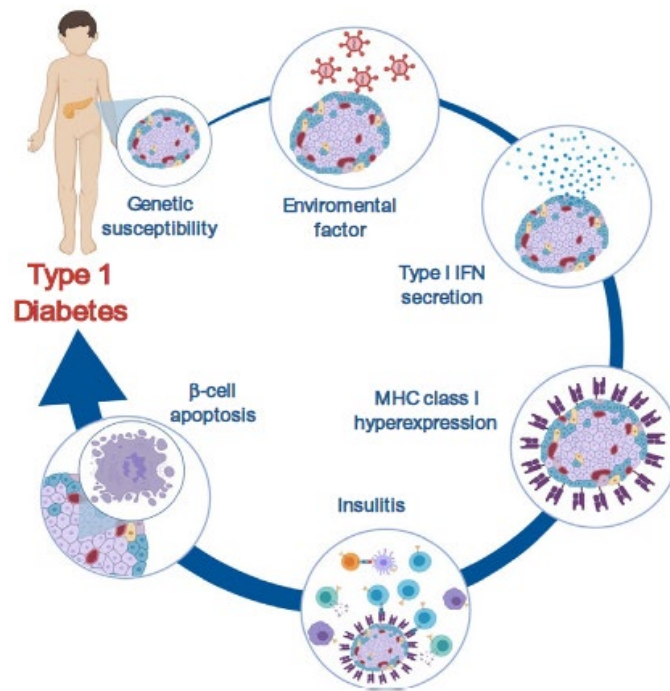


Figura 1. Hipótesis propuesta del desarrollo de la patología de la DT1. En individuos genéticamente predispuestos, el contacto con desencadenantes ambientales, como puede ser una infección vírica temprana, desencadena una inflamación crónica de los islotes pancreáticos. En respuesta, las células β pancreáticas secretan IFNs tipo I, que activan genes de respuesta a interferón y aumentan la expresión de MHC-I, lo que facilita el reclutamiento de células inmunes y la presentación de autoantígenos lo que lleva a que se perpetúe la inflamación y el microambiente pancreático entre en un estado conocido como insulinitis. Este periodo contribuye a la pérdida de tolerancia inmunológica y a la apoptosis de las células β , culminando en el desarrollo clínico de la enfermedad al perder la masa y función de las células β pancreáticas (8).

1.1.1. Etapas clínicas de la DT1.

Durante mucho tiempo, se consideraba que la DT1 empezaba cuando se daban los síntomas clínicos de la diabetes como poliuria, polidipsia, pérdida de peso, fatiga y cetoacidosis diabética. Pero tras décadas de investigación y los avances en la comprensión de la enfermedad, se ha redefinido la DT1 como un proceso progresivo y multifásico que comienza meses e incluso años antes del diagnóstico (14–17). Estudios prospectivos realizados por varios consorcios internacionales han demostrado que se puede detectar biomarcadores de DT1, permitiendo tanto la identificación temprana de personas en riesgo como la caracterización de la progresión de la enfermedad (16,18). Para estandarizar la parte presintomática de la DT1, se ha clasificado en etapas dependiendo de la aparición de autoanticuerpos, la homeostasis de la glucosa y la aparición de los síntomas.

Previo al comienzo de la patología, se ha visto que hay un componente genético relevante en los individuos, el cual determina su susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Esta predisposición genética viene definida por una serie de loci asociados

a genes a los que se les conoce como genes candidatos para la DT1. Un gen candidato es una variante genética o un gen que se ha identificado, o propuesto, dentro de las regiones del genoma asociadas al riesgo o protección de desarrollar la DT1 (19). La mayoría de estos genes candidatos se descubren a través de estudios de asociación de genoma completo (GWAS), los cuales se basan en estudios de variantes genéticas comunes en individuos afectados por una enfermedad para detectar las variantes genéticas asociadas con esta. Se han identificado más de 100 loci asociados con el riesgo genético a desarrollar DT1 (19,20). Dentro de ese grupo, los genes del MHC-I y MHC-II confieren el riesgo genético más elevado, explicando alrededor del 40% del riesgo genético de la DT1 (19). A este locus se le une el locus del gen de la insulina que también contribuye de manera moderada al riesgo (19,20). Muchos de estos genes participan en la inmunidad innata, la actividad antiviral entre otras, por ejemplo, genes como PTPN2 o TYK2, además de que aproximadamente el 90% de las variantes de riesgo de DT1 identificadas por GWAS se encuentran en regiones no codificantes (19,21–23).

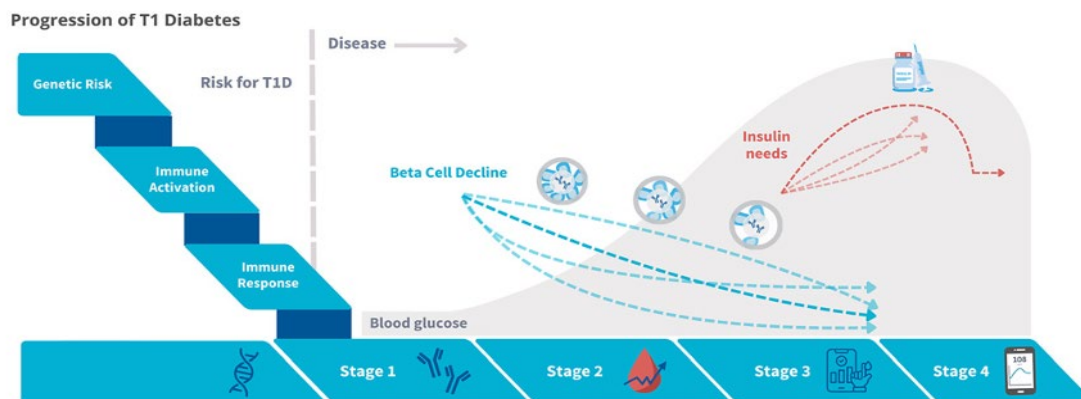


Figura 2. Etapas preclínicas de la DT1. Etapas preclínicas enseñando la progresión de la DT1. Hay 3 etapas, caracterizadas según 3 parámetros: si hay autoinmunidad, niveles de glucemia en sangre y si hay sintomatología (18).

Seguendo la figura 2, existen 4 etapas que se agrupan en: etapa 1, etapa 2, etapa 3 y etapa 4 (18).

En la **etapa 1** se incluyen aquellos individuos que presentan 2 o más autoanticuerpos específicos contra los islotes que conservan todavía suficiente masa de célula β funcional para mantener la normoglucemia. Los principales autoanticuerpos de los islotes suelen ser frente a la insulina, la glutamato descarboxilasa 65 (GAD65), la tirosinas fosfatasa 2 (IA-2) y el transportador de Zinc 8 (ZnT8). En el momento en el que la persona llega a esta primera etapa donde aparece la autoinmunidad, con dos o más

autoanticuerpos confirmados, se considera que tiene DT1 en etapa temprana y ya no debe ser referida como en riesgo de DT1 (18). Entre los individuos que se encuentran en esta etapa, el 44% presentará el cuadro clínico en 5 años y entre el 80-90% en 15 años (15,18).

En la **etapa 2** se incluyen aquellos individuos en los que persisten dos o más autoanticuerpos y, debido a la pérdida progresiva de célula β , se observan alteraciones en la homeostasis de la glucosa (disglucemia), aunque todavía son clínicamente asintomáticos. Entre los individuos que se encuentran en esta etapa 2, alrededor del 75% progresará a DT1 clínica en 5 años y el 100% debutará en algún momento de su vida (15,18).

En la **etapa 3** se incluyen aquellos sujetos que presentan autoanticuerpos y se caracteriza por la hiperglucemia debido a la avanzada pérdida de masa funcional de células β , en donde aparecen los síntomas clásicos asociados a la DT1, como poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable. En este momento, se dice que el individuo ha debutado con DT1 (15,18).

Por último, la **etapa 4** incluye la DT1 de larga duración. Se incluyen aquellos individuos que conviven con la DT1 desde hace muchos años, y se caracteriza por la aparición de complicaciones a largo plazo relacionadas con la enfermedad como retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética. Además, en ocasiones la presencia de autoanticuerpos se puede ver reducida en sangre (16,18,24).

La clasificación por etapas de la parte preclínica de la enfermedad permite estandarizar las diferentes fases en la progresión de la enfermedad durante la etapa donde el ataque autoinmune es más activo (25). De este modo, dicha clasificación permite estratificar de manera específica a los pacientes, lo que facilita el desarrollo de terapias, la medicina personalizada y el diseño adecuado de ensayos clínicos teniendo en cuenta los perfiles de riesgo, los sujetos y los biomarcadores característicos de cada etapa (15,18).

1.2. Sistema inmune.

El sistema inmune es una red altamente especializada de células, órganos y tejidos cuya función principal es mantener el funcionamiento estable del cuerpo para prevenir o limitar que factores externos o internos, como infecciones, células anómalas y agentes extraños alteren ese equilibrio. Para llevar a cabo su función, el sistema inmunológico debe ser capaz de distinguir entre células normales y sanas frente a células infectadas o con alguna desregulación (26–28). Esto lo hace siendo capaz de reconocer patrones determinados de señales de peligro y mediante la comunicación entre las células inmunológicas. Una respuesta inmune desregulada puede provocar que las defensas

no se activen cuando es necesario, que se activen sin que exista una amenaza real o que, aun activándose correctamente, no se desactiven una vez superado el peligro (26).

Dentro del sistema inmune, las células inmunológicas se pueden dividir en dos grandes linajes: células del sistema inmune innato y células del sistema inmune adaptativo.

La **inmunidad innata** es la primera línea de defensa del cuerpo y actúa de forma rápida y no específica ante las amenazas que detecta, de modo que las células que participan en la inmunidad innata no requieren contacto previo con el patógeno para activarse. Dentro de este grupo tenemos los neutrófilos, macrófagos, monocitos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, mastocitos y células NK (del inglés natural killer).

En cambio, la **inmunidad adaptativa** actúa de forma más lenta, pero proporciona una respuesta más específica y con memoria inmunológica. Las células involucradas de la inmunidad adaptativa requieren de activación previa por un antígeno. Dentro de este grupo se incluyen los linfocitos B, las células plasmáticas y los linfocitos T, que incluyen las subpoblaciones T CD4⁺ (cooperadores), linfocitos T CD8⁺ (citotóxicos), linfocitos T reguladores y linfocitos de memoria (27–29).

Tipo celular	Inmunidad	Función principal
Neutrófilos	Innata	Fagocitosis.
Macrófagos	Innata	Fagocitosis, activación de linfocitos y secreción de TNF- α e IL-1 β (entre otras).
Monocitos	Innata	Precusores de macrófagos y dendríticas.
Células NK	Innata	Eliminación de células infectadas o tumorales sin sensibilización previa.
Células dendríticas	Innata/adaptativa	Presentación de antígenos a linfocitos T.
Linfocitos B	Adaptativa	Presentación de antígenos a linfocitos T y producción de anticuerpos.
Linfocitos T CD4⁺ o cooperadores	Adaptativa	Coordinación de la respuesta inmune, y activan linfocitos B y T CD8 ⁺ .
Linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos	Adaptativa	Eliminación de células infectadas.
Linfocitos T reguladores	Adaptativa	Regulación/supresión de respuestas excesivas.
Linfocitos T de memoria	Adaptativa	Respuesta rápida en reinfecciones.

Tabla 1. Células más importantes en la respuesta inmune. En esta tabla se organizan las células más importantes para la respuesta del sistema inmune, organizándolas según si participan en la respuesta innata o la respuesta adaptativa, y con las funciones principales que realizan.

Estas células no actúan de forma aislada, sino que actúan conjuntamente utilizando señales químicas conocidas como citoquinas y quimiocinas, y reconociendo patrones moleculares asociados al peligro (DAMPs) o a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

En relación con **las citoquinas**, estas son proteínas pequeñas que regulan la función de otras células. Algunos ejemplos son: IFN α secretado por las células infectadas y principalmente por células dendríticas plasmocitoides (pDCs), IFN γ secretado principalmente por linfocitos T CD8⁺ activados o células NK, y TNF- α secretado principalmente por macrófagos activados, aunque también por otro tipos celulares como linfocitos T y células dendríticas (27,28). Sus funciones claves son coordinar la inflamación, la tolerancia inmunológica y la reparación tisular. Dentro del grupo de las citoquinas, existe un subtipo especializado en dirigir el tráfico celular conocidas como quimiocinas. Algunos ejemplos son: CXCL10, CCL2 y CXCL1, y actúan como quimioatrayentes guiando hacia sitios de inflamación, infección, daño tisular o linfocitos activados (30,31). Estas señales químicas son principalmente secretadas por células inmunológicas, aunque se ha visto que en ciertas condiciones fisiopatológicas casi cualquier tipo celular es capaz de producirlas.

Si hablamos de los patrones moleculares reconocidos por el sistema inmune, por un lado, tenemos los DAMPs, o patrones moleculares asociados a daño, que son señales que las células liberan cuando están dañadas o bajo estrés, por ejemplo, el ATP extracelular. Estas moléculas funcionan como una especie de alarma para el sistema inmunitario, avisando de que algo no va bien. Por otro lado, los PAMPs, o patrones moleculares asociados a patógenos, son moléculas que provienen directamente de agentes infecciosos como virus o bacterias, y que permiten al sistema inmune detectar la presencia de una infección (26,32,33). Estos patrones son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), entre ellos los receptores tipo Toll y los receptores tipo RIG-1. Estos receptores se expresan en muchos tipos celulares, entre ellos macrófagos, células dendríticas y la propias células β , una vez activados, inducen la respuesta inflamatoria mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α e IFNs tipo I, dependiendo del tipo celular (32).

En la fisiopatología de la DT1, la interacción entre el sistema inmune y las células β es compleja y bidireccional, manteniendo un diálogo patológico y dinámico donde ambos participan activamente en la progresión de la enfermedad. Tradicionalmente, se consideraba que la DT1 era causada de manera unidireccional por células T autorreactivas que destruían las células β sanas por error. Sin embargo, investigaciones

recientes sugieren que es un proceso más complejo donde las células β participan activamente en su propia destrucción (32). Se sugiere que las células β , bajo condiciones de estrés, infecciones virales o presión inmunológica, secretan citoquinas y quimiocinas (p.ej., IFN α) y liberan DAMPs (p.ej., ATP extracelular) que alertan al sistema inmune (32).

Siguiendo en el contexto de la DT1, el sistema inmune innato es el responsable por activar las cascadas inflamatorias que marcan el inicio del proceso autoinmune. De acuerdo con el modelo propuesto en la figura 1, la inflamación persistente mediada por células como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas se da tras la secreción de IFNs tipo I por parte de las células β . Estas células del sistema inmune son responsables de la inflamación persistente, que amplifican mediante la detección de PAMPs y DAMPs. (32).

Se ha visto que existen diversos tipos celulares dentro del sistema inmune innato que pueden tener una participación en el desarrollo de la DT1. Por ejemplo, hay evidencia de que los **neutrófilos** se infiltran a los islotes pancreáticos en las fases iniciales de la patología y, al ser activados, liberan señales conocidas como Trampas Extracelulares de neutrófilos (NET). Las NET podrían estar promoviendo la inflamación local y la presentación de autoantígenos por la célula β , actuando como fuente de DAMPs para linfocitos B y células dendríticas contribuyendo a la ruptura de la tolerancia inmunológica (33). Además, las **células NK** podrían desempeñar un papel proinflamatorio al liberar citoquinas como IFN γ , que activa a macrófagos y favorece la presentación antigénica. Esto se relaciona con el hecho de que en personas con DT1, se ha descrito un fenotipo disfuncional de estas células: tienen la expresión de receptores inhibitorios KIRs alterada, lo que dificulta la capacidad para distinguir células sanas y patológicas (32,33).

Pero, si bien la respuesta inmune innata es la que desencadena el inicio de la DT1, la respuesta inmune adaptativa tiene un papel fundamental en la progresión de esta patología. Una característica de la DT1 es la presencia de autoanticuerpos producidos por **linfocitos B** (34–36). Aunque la producción de autoanticuerpos es una de las funciones más reconocidas de estas células, hay evidencias que demuestran que también actúan activamente en la DT1 como células presentadoras de antígenos, facilitando la activación de **linfocitos T CD4⁺** (33,36). Además, los linfocitos B son capaces de reconocer DAMPs y PAMPs a través de sus receptores de antígeno y de los receptores tipo Toll (TLR) (31). Esta doble activación convierte a los linfocitos B en potentes promotores de la inflamación en la DT1. Por su parte, los linfocitos T CD4⁺ desempeñan una función clave en la coordinación de la respuesta inmunitaria en la DT1,

ya que son capaces de reconocer antígenos derivados de los islotes presentados por moléculas del MHC-II, tanto en células dendríticas como en linfocitos B. Además, estas células secretan IFN γ , lo que potencia la actividad de los macrófagos comentada previamente, así como IL-2, esencial para la expansión clonal de linfocitos T efectores (25,33,37).

Por último, dentro de este linaje se encuentran los **linfocitos T CD8⁺**, considerados los principales efectores directos en la destrucción de las células β pancreáticas. Su mecanismo de acción consiste en el reconocimiento de péptidos derivados de proteínas como insulina, presentados por moléculas del MHC-I en la superficie de las células β , cuya expresión se ve aumentada por la acción de IFNs tipo I. En la figura 3, se puede ver la etapa donde los linfocitos T CD8⁺ tras su activación se infiltran en los islotes pancreáticos y que después, mediante diversas vías de muerte celular, provocarán la destrucción de las células β (33).

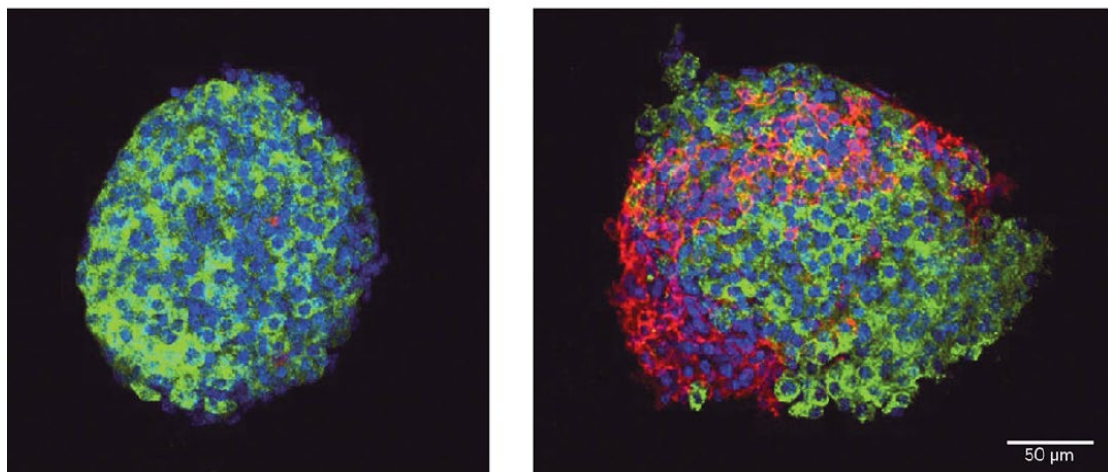


Figura 3. Imagen del microscopio confocal de islotes de ratones diabéticos no obesos (NOD). Los islotes se encuentran marcados para insulina (verde), CD45 (rojo) y núcleos en azul. En la imagen se muestran un islote sin insulitis (izquierda) y un islote del mismo ratón infiltrado por T CD8⁺ (derecha) (Imagen modificada de (33)).

En el estudio del sistema inmunológico humano, se utiliza con frecuencia el término células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés) para referirse a un conjunto heterogéneo de células inmunes que comparten la característica morfológica de poseer un único núcleo. Este grupo celular está compuesto mayoritariamente por linfocitos T, incluyendo subpoblaciones como CD4⁺, CD8⁺ y linfocitos T reguladores, así como linfocitos B primitivos y de memoria, y células Natural Killer (NK). En menor proporción, también incluye monocitos y las células dendríticas (38,39).

Estas células toman un papel relevante en la investigación DT1, especialmente si se considera que una de las principales limitaciones para el estudio directo de esta enfermedad es la imposibilidad de obtener biopsias de islotes pancreáticos (25). En cambio, las PBMCs se pueden obtener de una manera poco invasiva mediante una simple extracción de sangre, y participan igualmente en el diálogo aberrante entre el sistema inmune y la célula β (40). Además, se están desarrollando nuevas estrategias que utilizan las PBMCs como modelo de estudio en medicina personalizada, ya que comparten la misma genética que el resto de células del organismo (39), lo que permite explorar mecanismos inmunopatológicos específicos de cada paciente.

1.3. Las vías del interferón y su importancia en la DT1.

Las citoquinas son proteínas secretadas que actúan como moléculas mensajeras, generando una respuesta inmune colectiva y regulada. Entre los grupos de citoquinas existentes, destaca un grupo particular que son los IFNs. (41).

Los IFNs son una familia de citoquinas secretadas en respuesta a estímulos externos. Según las características estructurales y las vías de señalización que activan, se pueden definir tres clases de IFNs: IFNs tipo I (IFN α , IFN β , IFN κ , IFN δ , IFN τ , IFN ϵ e IFN ω), tipo II (IFN γ) y tipo III (IFN λ 1-4) (41).

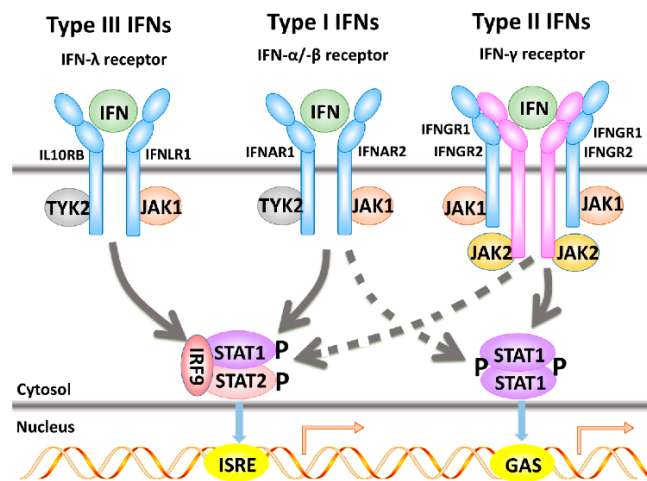


Figura 4. Rutas de señalización de los IFNs tipo I, II y III.

Los IFNs tipo I, se unen a IFNAR1/IFNAR2 que están unidos intracelularmente a las quinasas TYK2/JAK1 que activarán a los factores de transcripción STAT1 y STAT2 formando un heterodímero que finalmente se unirá a la proteína IRF9 para formar el complejo ISGF3 que traslocan al núcleo, y se unirá a elementos ISRE activando así la transcripción de genes de respuesta a interferón (ISGs) como *MX1*. Los IFNs tipo II, se unen a

IFNGR1/IFNGR2 que están unidos intracelularmente a las quinasas JAK1/JAK2 que fosforilan al factor de transcripción STAT1 activándolo y formando homodímeros STAT1-STAT1 que se traslocan al núcleo, y se unen a elementos GAS para inducir la transcripción de genes como *CXCL10*. Los IFNs tipo III, se unen a un receptor heterodimérico específico IL10RB/IFNLR1, que muy similar a los IFNs tipo I, señalizan a través de la unión de estos a las proteínas TYK2/JAK1 y que activan a los factores de transcripción STAT1 y STAT2. Este heterodímero se unirá finalmente a la proteína IRF9 para formar el complejo ISGF3 que traslocan al núcleo, y se unirá a elementos ISRE activando así ciertos ISGs (43).

Según la cascada de señalización clásica representada en la Figura 4, los IFNs tipo I se unen al receptor de IFNs tipo I (IFNAR), que es un heterodímero compuesto por dos subunidades transmembrana, IFNAR1 e IFNAR2. La unión del ligando al IFNAR provoca un cambio conformacional en el receptor, lo que recluta y activa dos quinasas de la familia Janus quinasa (JAK) llamadas JAK1 y TYK2 (Tirosina quinasa 2). La activación de JAK1 y TYK2 induce la fosforilación y activación de las proteínas STAT1 y STAT2 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 1 y 2*). Una vez activadas, STAT1 y STAT2 heterodimerizan (STAT1-STAT2) y se asocian con IRF9 (*Interferon Regulatory Factor 9*) para formar el complejo ISGF3 (*Interferon-Stimulated Gene Factor 3*). El complejo ISGF3 se transloca al núcleo y se une a secuencias específicas de ADN llamadas elementos de respuesta a interferón (ISRE, del inglés *Interferon-Stimulated Response Element*) que se encuentran en los promotores de los genes estimulados por IFNs (ISGs). Es la unión de ISGF3 a ISRE que activa la transcripción de decenas a cientos de ISGs (42).

Por otra parte, los IFNs tipo II se unen al receptor de IFN γ (IFNGR), que es un heterotetrámero formado por dos cadenas IFNGR1 y dos cadenas IFNGR2. Al unirse el IFN γ , hay la inducción de la dimerización funcional del receptor y la subsecuente activación de las proteínas quinasas JAK1 y JAK2, las cuáles se fosforilan entre sí y fosforilan a STAT1. Tras su fosforilación, STAT1 forma homodímeros (STAT1-STAT1) que se translocan directamente al núcleo, donde se unen a secuencias específicas de ADN llamadas GAS (*Gamma Activated Sequence*), ubicadas en los promotores de los genes estimulados por IFN γ . Esta unión activa la transcripción de diversos ISGs (42).

Los IFNs tipo I son moléculas clave en la respuesta del sistema inmune innato y adaptativo, siendo las primeras moléculas de acción frente a infecciones virales. Se sabe que participan en numerosas funciones biológicas e inmunológicas como son la presentación de antígenos y la secreción de citoquinas y quimiocinas (41). Se ha visto que, cuando hay una exposición persistente a IFNs de tipo I puede favorecer la infiltración de células T autorreactivas en tejidos (41). Se ha observado una clara vinculación entre una secreción aberrante de interferones tipo I y el desarrollo de enfermedades autoinmunes, entre ellas la diabetes tipo 1 (44,45). Estos interferones, y en particular el IFN α , generan un entorno inflamatorio que favorece la pérdida de la tolerancia inmunológica. En este contexto, IFN α induce la sobreexpresión de moléculas HLA en las células β pancreáticas, incrementa la presentación de autoantígenos y promueve la atracción de células inmunes hacia los islotes, lo que conduce a la activación de linfocitos autorreactivos y a la progresión autoinmune característica de la enfermedad (46). Además, cada vez existe más evidencia de que la exposición

prolongada a interferones tipo I altera la función de los linfocitos B, favoreciendo la secreción de autoanticuerpos y, con ello, la pérdida de tolerancia inmunológica (6).

En cuanto al IFN γ , este juega un papel central en el proceso de reconocimiento y destrucción celular mediado por células T CD8 $^{+}$. Además de su función citotóxica directa, estas células también secretan citoquinas y quimiocinas que amplifican la respuesta inmunitaria (25,47). Esta secreción contribuye al reclutamiento de otras células inmunes al sitio de la inflamación, promoviendo un microambiente inflamatorio que potencia la activación celular y favorece la presentación de antígenos a células efectoras adicionales. Se han visto, que la hiperexpresión de IFN γ en células β lleva al desarrollo de DT1 en ratones, lo que indica que es un aspecto clave en la patología de esta enfermedad (25).

1.4. Tratamientos para la DT1.

Actualmente, sólo existen tratamientos de intervención una vez ya se ha dado el debut del individuo con DT1, que sería la administración de insulina de manera exógena, permitiendo a los pacientes controlar sus niveles plasmáticos de la glucosa. La problemática radica en que, aunque gracias a esa administración exógena de insulina la patología ya no es mortal, los pacientes siguen teniendo muchas complicaciones médicas asociadas a la enfermedad. La posibilidad de sufrir cetoacidosis y picos hipoglucémicos son de las causas que más ponen en peligro la vida de los pacientes con DT1. De hecho, los picos hipoglucémicos están relacionados con efectos perjudiciales en la función cognitiva y entre el 4 y el 10% de las muertes por DT1. Además, el control de la glucosa es muy difícil, pudiéndose dar en muchas ocasiones picos hiperglucémicos, que son la principal causa de complicaciones médicas también asociadas a la enfermedad, como problemas microvasculares que se pueden manifestar como neuropatías, nefropatías y retinopatías, y/o problemas macrovasculares, como aterosclerosis y trombosis en diferentes órganos del cuerpo (9).

Con el paso del tiempo, se han ido haciendo mejoras en el tratamiento con insulina exógena: desde la creación de bombas de insulina automáticas con sensor de glucosa, insulinas con diferentes tiempos de acción e incluso avances en la forma de administración, insulinas orales (48). No obstante, estos avances aún no cubren la necesidad de un tratamiento efectivo que permita prevenir la enfermedad y así evitar su debut clínico. En este contexto, se está prestando creciente atención al desarrollo de tratamientos preventivos capaces de intervenir en fases tempranas del proceso autoinmune, como es el caso de las inmunoterapias dirigidas (por ejemplo, anticuerpo

monoclonal anti-CD3) y los inmunomoduladores (por ejemplo, los inhibidores de JAK), con el objetivo de retrasar o evitar la progresión hacia el debut clínico.

1.4.1. Inmunoterapias e inmunomoduladores para el tratamiento de la DT1.

Las **inmunoterapias** son tratamientos que utilizan elementos propios del sistema inmune o moléculas diseñadas para modificar la respuesta inmune concreta, especialmente contra una diana específica, como una célula, antígeno o receptor. Por otro lado, los **inmunomoduladores** son sustancias que modifican y regulan el funcionamiento del sistema inmunológico. No necesariamente suprimen toda la respuesta inmune, sino que pueden potenciarla o inhibirla parcialmente, dependiendo del objetivo terapéutico.

Actualmente, hay sólo una terapia aprobada para el tratamiento con la DT1, pero se están desarrollando diferentes estrategias que ya se encuentran ahora mismo en ensayos clínicos con el potencial de ayudar a mejorar el pronóstico de la patología.

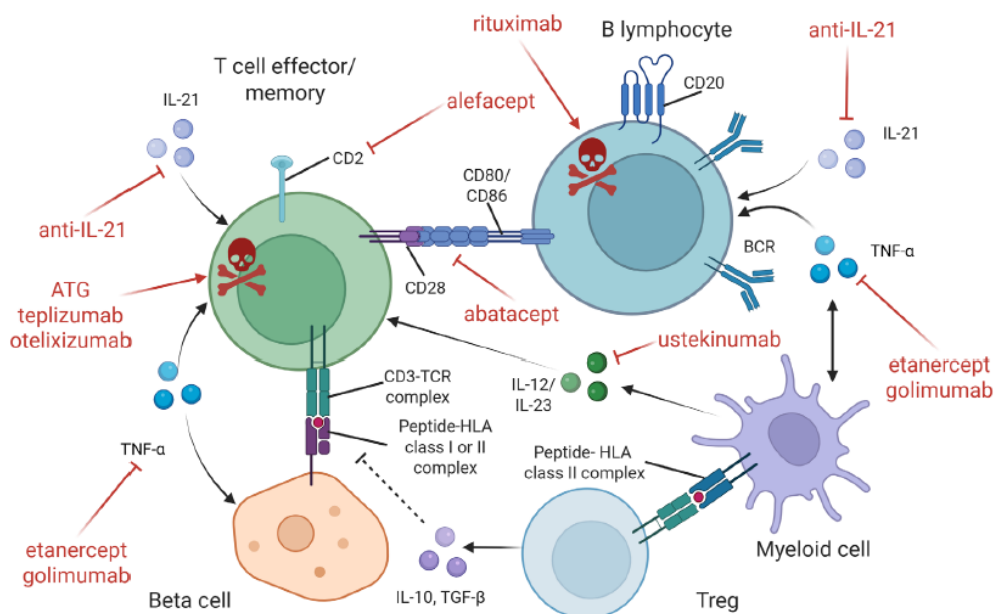


Figura 5. Dianas terapéuticas para inmunoterapias frente a la DT1. En el esquema se muestran algunos de los fármacos que se dirigen a diferentes dianas terapéuticas con gran potencial de regular y mejorar la progresión de la DT1 (49).

En la Figura 5 se presentan algunas de las principales interacciones celulares e inmunológicas implicadas en la destrucción de las células β pancreáticas pueden interferir en las diversas etapas de la respuesta autoinmune. Representada en verde se encuentra la célula T efectora o de memoria, que reconoce antígenos presentados por

las células β y otras células presentadoras de antígenos a través del complejo CD3-TCR y moléculas del MHC-I o MHC-II, lo que lleva a la activación y producción de citoquinas proinflamatorias como IL-21 y TNF- α que contribuyen a la destrucción de las células β . Pero no todas las estrategias van dirigidas hacia la célula T, sino que también hay posibles terapias frente a linfocitos B, que también presentan antígenos, linfocitos T reguladores y células mieloides que modulan la respuesta inmune a través de la secreción de citoquinas como IL-10 y TGF- β (49). Además, en la Figura 5 también se resaltan en rojo los principales fármacos inmunomoduladores o inmunoterapias en desarrollo o aprobados para el tratamiento de la DT1. Paso a describir de forma resumida algunas de las más destacadas.

Inmunoterapias:

- Rituximab. Es un anticuerpo monoclonal anti-CD20 que destruye los linfocitos B. Se encuentra en ensayos de fase II y se ha visto que es capaz de reducir el descenso de los niveles del péptido C, además de una reducción de la hemoglobina glicosilada durante 1 año, aunque no se mantiene hasta los 2 años (50,51).
- Alefacept. Es una proteína de fusión que une la porción extracelular del antígeno 3 asociado a la función de los linfocitos (LFA-3) con la inmunoglobulina G1, bloqueando la interacción entre LFA-3 y CD2. De esta manera, inhibe la activación y proliferación de los linfocitos T CD2⁺ de memoria. Se ha visto que es capaz de preservar los niveles de péptido C y reduce los niveles de insulina exógena necesaria en los 24 meses que duró el estudio (52). Se encuentra en ensayos clínicos de fase II.
- Abatacept. Es una proteína de fusión compuesta por el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) e inmunoglobulina G1. Actúa inhibiendo la coestimulación de linfocitos T al bloquear la señal coestimuladora CD80/CD86 en células presentadoras de antígeno. Se ha visto en ensayos clínicos que retrasa el descenso de los niveles de péptido C. Se encuentra en fase II (53,54).
- Anti-IL-21. Actúa a través de bloqueo del tráfico de linfocitos T diabetogénicos. Está en ensayos clínicos de fase II y se ha visto que en combinación con otras terapias (p. ej., el liraglutide) es capaz de reducir el descenso de los niveles de péptido C (55).
- Ustekinumab. Es un anticuerpo monoclonal que bloquea las interleucinas (IL) IL-12 e IL-23 que actúa bloqueando la diferenciación en linfocitos Th17. Se encuentra en ensayos clínicos de fase II, habiéndose visto ya que es capaz de preservar los niveles de péptido C durante al menos 1 año (56).
- Teplizumab. Actualmente, la única inmunoterapia aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos es el teplizumab,

que ha sido autorizado para su uso clínico en la prevención de la DT1 (49). El teplizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado, diseñado frente a la molécula CD3 del receptor de células T, actuando sobre los linfocitos T maduros CD4⁺ y CD8⁺. Fue en 2019, cuándo se realizó un ensayo clínico que se centraba en comprobar si el teplizumab intravenoso (14 días de tratamiento) en pacientes con DT1 preclínica era capaz de retrasar la progresión de la enfermedad. Lo que se observó es que, el tratamiento con teplizumab retrasó significativamente el tiempo medio hasta la progresión de la enfermedad de la etapa 2 a la etapa 3 de la DT1 (los pacientes del estudio se encontraban en la etapa 2 preclínica al inicio del estudio). También se mejoró y preservó la función de las células β en los pacientes tratados (57). Gracias a estos hallazgos, la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó el teplizumab para esta indicación específica en pacientes de 8 o más años con DT1 preclínica en etapa 2. Posterior a este estudio, en 2023 se realizó un ensayo clínico que se centró en niños y adolescentes (entre 8 y 17 años) que ya se encontraban en etapa 3, es decir, habían debutado recientemente con DT1 clínica, esto con el objetivo de comprobar si el teplizumab es capaz de intervenir una vez ya han comenzado a manifestarse los primeros síntomas de la enfermedad y de esta manera preservar la función de la célula β tras el diagnóstico. Se observó que el teplizumab no sólo es capaz de retrasar la progresión de la DT1 preclínica, sino que es capaz de preservar significativamente la función residual de las células β en pacientes recién diagnosticados (58).

Inmunomoduladores:

- Globulina antitimocítica (ATG). Es un anticuerpo policlonal anti-linfocitos T que actúa reduciendo todo tipo de linfocito T. Se encuentra en fase II de ensayos clínicos y se ha visto que preserva los niveles de péptido C además de que reduce la hemoglobina glicada en 24 meses (59).
- Etanercept y golimumab. Actúan impidiendo la unión de TNF- α a su receptor. Etanercept es una proteína de fusión que se une al TNF α , mientras que golimumab es un anticuerpo monoclonal que se une directamente al TNF α . Se encuentra en ensayos clínicos de fase II, aunque ya se ha comprobado que es capaz de mantener los niveles de péptido C a 1 y 2 años (60–62).
- Los inhibidores de JAK. son inmunomoduladores que actúan impidiendo la señalización de varias citoquinas, especialmente los IFNs. En la figura 6 se muestra la estructura tridimensional característica de las proteínas JAK quinasas con sus distintos dominios. El mecanismo común en la mayoría de los inhibidores de JAK clásicos como el baricitinib o tofacitinib consiste en la unión del inhibidor al dominio quinasa de las

proteínas JAK, específicamente al sitio de unión del ATP (dominio JH1). Al ocupar este sitio, se impide la autofosforilación y activación de JAK, bloqueando la vía de señalización JAK-STAT (63–65). A parte de este mecanismo, hay otros inhibidores de JAK que no se unen al sitio de unión al ATP (dominio quinasa), sino que se unen al dominio pseudoquinasa, específicamente al dominio JH2, que es un regulador alostérico del dominio quinasa. Por este motivo, es un inhibidor mucho más específico (65,66).

Como mencionado anteriormente, los IFNs juegan un papel crucial en el inicio de la patogénesis de la DT1. Por esta razón, terapias centradas en el bloqueo de la señalización de estas moléculas pueden ser clave para avanzar en el desarrollo de estrategias innovadoras para la DT1 (8,67). Por ejemplo, ya se ha visto que inhibidores de JAK1 y JAK2 pueden alterar la expresión del MHC clase I inducida por IFNs, alterar la activación de linfocitos T CD8⁺ y bloquear la formación de complejos entre las células β pancreáticas y las T CD8⁺ (68,69).

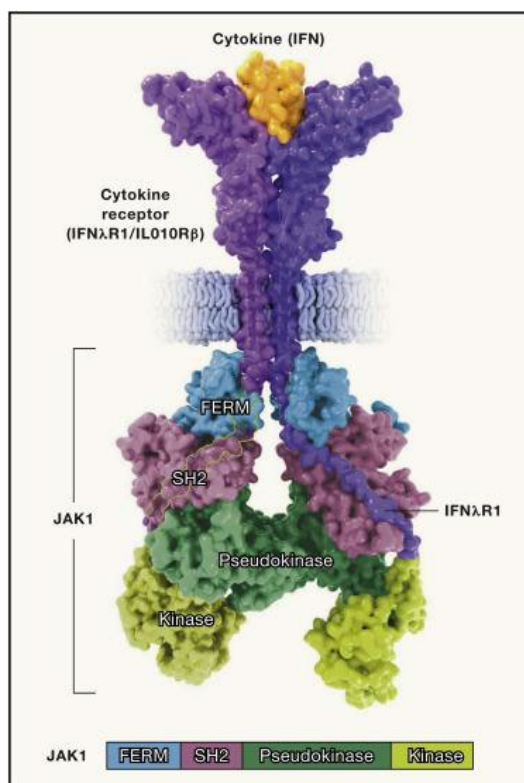


Figura 6. Imagen en 3D de la estructura de las JAK quinasas unidas al receptor de citoquinas.

En la imagen se ve representada la estructura en superficie del complejo IFNλR1/IL010Rβ/JAK1, donde se ven el dominio quinasa (JH1; representado en amarillo) y el dominio pseudoquinasa (JH2; representado en verde) (70).

Dentro de los inhibidores de JAK, el baricitinib es un inhibidor de JAK1/JAK2 de la primera generación que ya está aprobado para el uso en otras enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide y la alopecia areata (67). Basado en estudio preclínicos desarrollados en ratones diabéticos no obesos (NOD) y datos clínicos favorables en la eficacia de este inhibidor en otras enfermedades autoinmunes, el grupo

BANDIT evaluó si la administración de baricitinib era capaz de mantener la función de las células β y mejorar los valores metabólicos de pacientes recién diagnosticados con DT1 (67). En un ensayo clínico de fase II, doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo, se asignó a pacientes con DT1 diagnosticada en los 100 días previos a recibir baricitinib o placebo por vía oral durante 48 semanas. Este estudio concluyó que los pacientes tratados con baricitinib tenían unos niveles de péptido C 48% mayores que en el grupo placebo, lo que indica la preservación de la función de la célula β . Además, los pacientes tratados necesitaron menos dosis de insulina diaria y tuvieron un mejor control glucémico que el grupo placebo (67).

Aunque en este ensayo clínico inicial se evaluó su uso en pacientes recién debutados, el grupo plantea el uso de este fármaco en etapas anteriores para aumentar su efectividad, ya que se sabe que en el momento del diagnóstico de la enfermedad todavía queda un número de células productoras de insulina viables aceptable pero muy reducido (67). Al compararse con las terapias utilizadas actualmente frente a la DT1, como el teplizumab o el golimumab, el baricitinib aporta la ventaja de ser un tratamiento oral que genera resultados similares de niveles de péptido C (67).

A raíz de los buenos resultados de este estudio, se ha empezado a reclutar pacientes recién diagnosticados con DT1 para probar otros dos inhibidores de JAK aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos para otras enfermedades autoinmunes: abrocitinib y ritlecitinib. El abrocitinib (Cibinqo®) es un inhibidor oral de la proteína JAK1, y está aprobado por Reino Unido y Japón frente a la dermatitis atópica de moderada a grave en adultos y adolescentes mayores de 12 años, y ya hay solicitudes en otros países pendientes de aprobación (71). El ritlecitinib (LITFULO™) es un inhibidor oral de la JAK quinasa 3 y miembros de la familia de las TEC quinazas y está aprobado en Estados Unidos para el tratamiento frente a alopecia areata grave en adultos y adolescentes de más de 12 años. (72).

Además de los inhibidores de proteínas JAK en general, existen inhibidores específicos de alguna proteína JAK, como es el caso del deucravacitinib, un inhibidor alostérico de la proteína TYK2. Se ha visto, que TYK2 es un gen de susceptibilidad relevante en diversas enfermedades autoinmunes, incluida la DT1 (73). Hay evidencias de que este gen participa en la respuesta a IFN que puede llevar a la hiperexpresión de MHC-I clásica en el inicio de la patología (23). Este inmunomodulador está aprobado para la psoriasis en placa y se ha visto que tiene potencial terapéutico en otras enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico (73,74). Un estudio previo de nuestro grupo evaluó el potencial del deucravacitinib para prevenir la activación de la respuesta

inducida por IFNs y el daño causado en células β humanas. Los resultados demostraron que el deucravacitinib confiere protección frente a la citotoxicidad inducida por citocinas proinflamatorias como IFN α , IL-1 β e IFN γ , modelos in vitro de inflamación típica en DT1 (75). Estos hallazgos sugieren que podría representar una estrategia terapéutica prometedora para preservar la función de la célula β en etapas preclínicas o en pacientes recién diagnosticados.

2. Antecedentes y objetivos.

Para este proyecto, se ha tenido en cuenta estudios previos del laboratorio, dónde se demostró que el deucravacitinib, un inhibidor alostérico oral y selectivo de TYK2, es capaz de proteger células β humanas frente a daños inducidos por IFN α (75). Este trabajo demostró que deucravacitinib previno la sobreexpresión de MHC-I, redujo la inflamación (expresión y secreción de CXCL10) y previno la apoptosis de las células β , por lo que se propuso el uso de este inhibidor específico de TYK2 como terapia preventiva para la DT1. Por otro lado, los resultados se compararon con inhibidores menos selectivos de la familia JAK, como el baricitinib, para poder evaluar la eficacia del tratamiento propuesto con otros tratamientos, menos específicos pero dirigidos a la misma vía de señalización, ya en ensayos clínicos para el tratamiento de la DT1 (67,72).

Tradicionalmente, los estudios sobre los mecanismos moleculares implicados en la DT1 y la eficacia de terapias dirigidas se han realizado en modelos celulares como la línea de células β humanas EndoC- β H1. Aunque estos modelos permiten analizar procesos relevantes en células β , presentan importantes limitaciones, ya que no reflejan la heterogeneidad genética ni las características individuales de los pacientes con DT1. Además, el uso de islotes pancreáticos humanos resulta poco viable debido a la escasa disponibilidad de muestras, las dificultades técnicas asociadas a su aislamiento y la pérdida rápida de funcionalidad una vez extraídos del microambiente pancreático (76,77).

En este contexto, las PBMCs emergen como un modelo alternativo de gran interés, ya que pueden obtenerse mediante procedimientos mínimamente invasivos, conservan la información genética del donante y permiten valorar respuestas inmunitarias y terapéuticas de forma individualizada. Su aplicación ofrece, por tanto, un enfoque más cercano a la medicina personalizada en la DT1, con el potencial de identificar biomarcadores fiables y predecir la eficacia de diferentes estrategias terapéuticas (78).

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la utilidad de las PBMCs como modelo in vitro para estudiar el efecto de los inhibidores de JAK/TYK2 deucravacitinib y baricitinib en donantes control y en pacientes con DT1, tras la estimulación con IFN α e IFN γ .

Para cumplir este objetivo, se van a seguir los siguientes objetivos específicos:

1. Determinación y selección de los pacientes controles y pacientes con DT1. Se seleccionarán donantes que cumplan con los requisitos del estudio, y se aislarán muestras biológicas de PBMCs de cada uno.

2. Evaluación de la expresión de genes clave de respuesta a IFN en la progresión de la DT1 tras el tratamiento con IFN α o IFN γ en PBMCs derivados de pacientes control y pacientes con DT1 tratados con deucravacitinib o baricitinib.
3. Evaluar la secreción de citoquinas proinflamatorias en la progresión de la DT1 tras el tratamiento con IFN α o IFN γ en PBMCs derivados de pacientes control y pacientes con DT1 tratados con deucravacitinib o baricitinib.
4. Comparar la eficacia relativa de deucravacitinib y baricitinib en la inhibición de la respuesta a IFN, tanto a nivel de expresión génica como de secreción de quimioquinas, con el fin de identificar diferencias en su potencial terapéutico.

3. Materiales y métodos.

Todos los experimentos realizados en este trabajo están aprobados por el comité ético de la UMH con el código TFM.MBB.LME.SCM.250513, y está enmarcado dentro del proyecto UniSalut con referencia: iPSCinT1D.

3.1. Selección de los pacientes: criterios de inclusión y exclusión.

La selección de los pacientes se realizó en colaboración con la Dra. Evangelina Boix del servicio de Endocrinología del Hospital General Universitario de Elche. Se reclutaron voluntarios sanos (controles) y pacientes con DT1. Para los donantes sanos, los criterios de inclusión fueron que no padeciera DT1 o alguna otra enfermedad metabólica y ser mayor de edad, mientras que para los pacientes con DT1 los criterios de inclusión fueron que tuvieran la enfermedad y que fueran mayores de edad. Tanto los controles como los pacientes se escogieron de forma pareada en edad, sexo e índice de masa corporal (IMC). No se excluyó ningún paciente o control.

3.2. Aislamiento y cultivo de PBMCs.

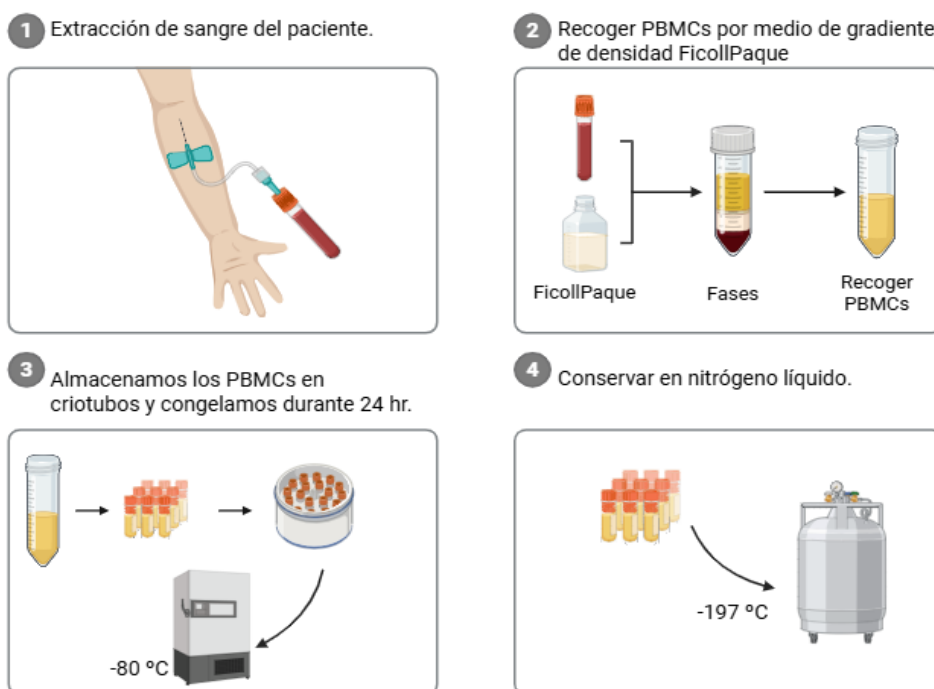


Figura 7. Resumen gráfico del protocolo de aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Esquema gráfico del protocolo de aislamiento de PBMCs a partir de sangre de los pacientes. En el primer paso se extrae la sangre, y después se separan las fases de esta por un gradiente de densidad y se recogen las PBMCs. Por último, se congelan a -80 °C gradualmente para después conservarlas en nitrógeno líquido.

3.2.1. Aislamiento de PBMCs:

1. La extracción de sangre periférica se realizó en tubos de extracción de sangre BD Vacutainer 10 ml por vacío Hematología K2EDTA (REF: 367525), siguiendo el protocolo estandarizado en el Hospital General Universitario de Elche. Se extrajeron 4 tubos de sangre por donante (Paso 1, Figura 7). Tras la extracción, la sangre se procesó en fresco, en condiciones de esterilidad, en cabina BL2 (Telstar Bio-II-A), según los pasos descritos a seguir.
2. La sangre se diluyó en tampón salino fosfato (PBS) estéril (1:1). Tras la dilución, se prepararon dos tubos cónicos de 50 ml con 15 ml de sangre diluida y 10 ml de Ficoll-Paque™ PLUS (Cytiva™), un medio de separación por gradiente de densidad (Paso 2, Figura 7). Se añadieron primero los 10 ml de Ficoll-Paque™ PLUS, y luego se vertieron muy despacio y con cuidado los 15 ml de sangre diluida, para evitar que los líquidos se mezclaran.
3. Estos tubos se centrifugaron durante 40 minutos a 400 g, a 20 °C. Durante esta centrifugación, debido al gradiente de densidad formado, los eritrocitos y granulocitos de la sangre atravesaron la capa de Ficoll y se depositaron en el fondo, ya que eran más densos. Por otro lado, las células mononucleares (linfocitos y monocitos, mayoritariamente) quedaron en una capa blanca intermediaria, justo sobre el Ficoll, mientras el plasma permanece en la capa superior (Paso 2, Figura 7).
4. Se recogió con una pipeta Pasteur la fracción de PBMCs (capa blanca), con cuidado de no arrastrar Ficoll de la capa inferior ni plasma de la capa superior, y se transfirió a un nuevo tubo cónico de 50 ml (Paso 2, Figura 7). Además, se recolectó plasma de pacientes y controles.
5. Tras transferir las células, se realizaron una serie de lavados con PBS:
 - Primero, se añadieron 3 volúmenes de PBS a las PBMCs y se centrifugaron 10 minutos a 300 g, a 20 °C. Se descartó el sobrenadante.
 - Se resuspendieron las células en 4 mL de PBS estéril con mucho cuidado. Cuando estuvieron completamente resuspendidas, se añadieron otros 4 mL y se centrifugaron nuevamente por 10 minutos a 300 g, a 20 °C. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante.
6. En el caso de que se quisiera preservar las células, estas se resuspendieron en medio de congelación compuesto por 90% FBS inactivado y 10% DMSO. Se guardaron en un contenedor de congelación (Nalgene™ Cryo -1 °C Freezing

Container) que permitió la congelación a velocidad de $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ en un ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 24 h (Paso 3, Figura 7). Tras ese tiempo, se traspasaron los viales a nitrógeno líquido ($-197\text{ }^{\circ}\text{C}$), donde se conservaron para su posterior uso (Paso 4, Figura 7).

3.2.2. Protocolo de descongelación de PBMCs.

1. Se preparó previamente un tubo cónico de 15 ml para cada vial que se utilizó, con 10 mL del medio de cultivo de PBMCs a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
2. Una vez descongelados, las PBMCs se transfirieron al tubo previamente preparado y se centrifugaron por 10 minutos a 300 g.
3. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células con medio de PBMCs.
4. Una vez completamente resuspendidas, las células se sembraron a una densidad de 500.000 células/pocillo en una placa de 96 con fondo redondo.
5. Las células se dejaron recuperar durante toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5% CO_2 antes de empezar los experimentos.

3.2.3. Cultivo y tratamiento de PBMCs.

Tanto para el cultivo como para el tratamiento de las PBMCs se utilizó medio RPMI-1640 (Gibco, ThermoFisher™) con rojo fenol, suplementado con 10% (v/v) de FBS inactivado y 100 U/ml de Estreptomicina/Penicilina (ambos).

Tras la recuperación durante toda la noche, las PBMCs se pretrataron con el vehículo en el que estaban disueltos los inhibidores (dimetilsulfóxido, DMSO), 5 μM baricitinib (Selleckchem, Planegg, Germany) o 1 μM deucravacitinib (Selleckchem, Planegg, Germany). Tras 24 h de pretratamiento, las PBMCs se trataron con $\text{IFN}\alpha$ (2000 U/ml, R&D Systems, 10984-IF-010) o $\text{IFN}\gamma$ (2000 U/ml, R&D Systems, 300-02-250UG) en ausencia o presencia de los pretratamientos durante otras 24 horas. Una vez pasado el tiempo de tratamiento, se recogieron los lisados celulares para estudiar la expresión génica por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa y cuantificación en tiempo real (RT-qPCR) y los sobrenadantes celulares para medir la secreción de citoquinas/quimiocinas en ensayos de Multiplex (Figura 8).

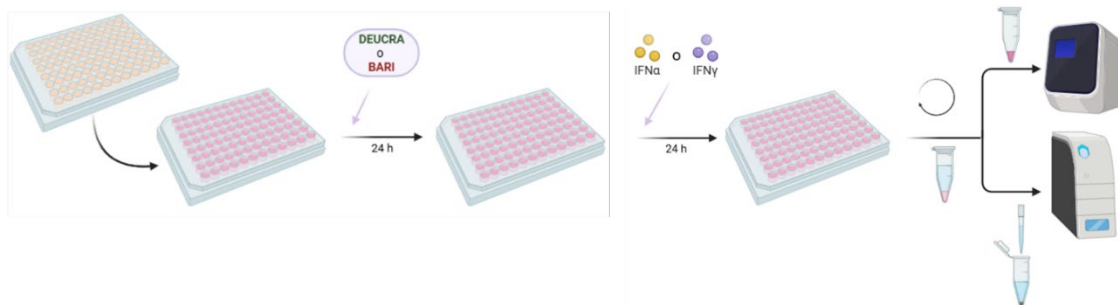


Figura 8. Esquema del tratamiento de PBMCs. Primero se sembraron las PBMCs en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Tras un periodo de reposo durante toda la noche, se pretrataron las células con vehículo o los inhibidores Deucravacitinib (DEUCRA) o Baricitinib (BARI) durante 24 horas. Finalmente, se trataron las células con IFN α o IFN γ durante 24 horas. Tras el tratamiento, se recogieron los lisados celulares para RT-qPCR y los sobrenadantes celulares para ensayos de Multiplex.

3.3. Extracción de RNA.

Se analizó la expresión génica de genes en respuesta a IFNs que participan en la vía de señalización de IFN, mediante la cuantificación del mRNA de dichos genes utilizando RT-qPCR. Para la extracción de RNA se utilizó el kit *NucleoSpin® DNA, RNA and Protein Purification*, (Macherey-Nagel, Ref. 740955.250, País) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante con ligeras modificaciones.

Para obtener los lisados celulares, las PBMCs se lisaron utilizando tampón de lisis *RA1* con 1% β -mercaptoetanol (v/v). Posteriormente, se congelaron dichos lisados a -80 °C hasta el momento de la extracción de RNA.

Extracción de RNA:

- Una vez descongeladas las muestras, se transfirió cada muestra de lisado celular a columnas de filtrado y se centrifugaron después a 11.000 g durante 1 minuto.
- Se añadió un volumen de la solución de etanol 70% en cada muestra y se homogenizó mediante el pipeteo.
- Se transfirió el homogenizado de cada muestra a una columna de purificación de mRNA.
- Las columnas se centrifugaron a 11.000 g durante 30 segundos; se descartó el sobrenadante eluido.
- Se añadió entonces 350 μ L de tampón *MDB* y se volvió a centrifugar a 11.000 g durante 1 minuto. Se descartó de nuevo el sobrenadante y, tras este paso, se añadió 95 μ L de la mezcla de DNasa y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

- Después de esta incubación, se llevó a cabo la serie de lavado: 200 μ L de RAW2 y una centrifugación de 11.000 g de 30 segundos; 600 μ L de RA3 y una centrifugación de 11.000 g de 30 segundos, y 250 μ L de RA3 con una centrifugación posterior de 11.000 g durante 2 minutos.
- Para asegurarnos de que no quedara humedad en la membrana, se llevó a cabo una centrifugación extra de 11.000 g y durante 2 minutos.
- Por último, se añadieron directamente sobre la membrana 20 μ L de tampón de elución de RNA y se eluyó el RNA con una centrifugación de 11.000 g y durante 1 minuto. Se recogió la elución en tubos tipo eppendorfs de 1,5 ml y se almacenó a -80°C .

3.4. Retrotranscripción.

Para la retrotranscripción del mRNA se utilizó el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™). Se preparó la mezcla de retrotranscripción según la Tabla 2. Para cada muestra, se añadieron 6,3 μ L de mezcla de retrotranscripción más 13,7 μ L de muestra en tubos libres de RNAsas.

Compuesto	Volumen (μ L)
10x Tampón RT	2 μ L
25x dNTPS (100 mM)	0,8 μ L
10x Hexámeros aleatorios	2 μ L
<i>Multiscribe</i> ™ RT	1 μ L
Inhibidor de RNAsa	0,5 μ L
Muestra RNA	13,7 μ L

Tabla 2. Composición de la mezcla de retrotranscripción y mRNA por cada muestra con *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™).

Se realizó la retrotranscripción en un termociclador (Termociclador T100™, Bio-Rad), siguiendo el protocolo siguiente:

	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (minutos)
Paso 1	25	10
Paso 2	37	120
Paso 3	85	5
Paso 4	4	∞

Tabla 3. Ciclos de temperatura de la retrotranscripción de las muestras de RNA.

Tras finalizar la retrotranscripción, se obtuvieron los cDNA de las muestras y se almacenaron a -20°C hasta la realización de la qPCR.

3.5. PCR cuantitativa.

Para la realización de la qPCR, se utilizó el kit *Iq SYBR Green SuperMIX (2X)* (Applied Biosystems™). Se preparó una mezcla principal según la Tabla 4.

Compuesto	Volumen (μL)/pocillo
Iq SYBR Green SuperMIX (2X)	5 μL
Cebador 5'	0.2 μL
Cebador 3'	0.2 μL
H ₂ O DEPC	3.60 μL
Muestra cDNA	1 μL

Tabla 4. Composición de cada pocillo de una placa de 96 para realizar la PCR.

Para realizar la lectura de la placa, se utilizó un termociclador C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad) acoplado a un lector de fluorescencia (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad). Se siguió el protocolo siguiente:

	Temperatura (C°)	Tiempo
Paso 1	95	3 minutos
Paso 2	95	15 s
Paso 3	60	1 minuto
Paso 4	Repetición de pasos 2 y 3 x40 ciclos.	
Paso 5	Incremento de temperatura de 60 °C a 95 °C en intervalos de 0,5 °C cada 5 segundos.	

Tabla 5. Ciclos de temperatura de la qPCR de las muestras de PBMCs.

Se midió la expresión de los genes β -actina (*ACTB*) que es utilizado como gen de referencia, *MX1* (*Interferon-induced GTP-binding protein*), que es un gen de respuesta a IFN clásico que codifica la proteína MX1 que interfiere con la replicación de ciertos virus, *HLA-ABC* (*Human leukocyte antigen complex ABC*), que participa en la presentación de antígenos y *CXCL10* (*C-X-C motif chemokine ligand 10*), que es una quimiocina marcadora de inflamación.

Cebador	Secuencia
<i>ACTB directo</i>	5'-CTGTACGCCAACACAGTGCT-3'
<i>ACTB inverso</i>	5'- GCTCAGGAGGAGCAATGATC -3'
<i>MX1 directo</i>	5'-GAGAACGGGAAGGAGACGC-3'
<i>MX1 inverso</i>	5'-CATCTCAGGGTGAGGGGCT-3'
<i>HLA-ABC directo</i>	5'-AGACAGGACCATCGGAATCT-3'
<i>HLA-ABC inverso</i>	5'-GTAACCCTTCTTCAGGTGGAAC-3'
<i>CXCL10 directo</i>	5'-GTGGCATTCAAGGAGTACCTC-3'
<i>CXCL10 inverso</i>	5'-GCCTTCGATTCTGGATTGAG-3'

Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados para la medición de los genes de interés.

3.6. Multiplex.

Para medir los niveles de péptido C en el plasma de sujetos control y pacientes con DT1, se utilizó el Kit básico humano ProcartaPlex™ (Invitrogen, ThermoFisher) siguiendo el protocolo del fabricante.

Para el análisis de los niveles de las quimiocinas CXCL10, CXCL1, CCL5 y CCL2 en los sobrenadantes recogidos, se empleó otro kit, en este caso el Kit básico humano ProcartaPlex™ (Ref.PPX-04-MXKA6ZZ, Invitrogen™, ThermoFisher), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Este tipo de ensayo se basa en la detección de analitos de interés en los sobrenadantes por medio de la unión de dichos analitos a anticuerpos específicos frente a ellos unidos a microesferas. Si los analitos están presentes en la muestra, se unen a microesferas específicas y estas, a su vez, a un anticuerpo marcado con un fluorocromo que permite su detección y cuantificación por citometría láser. Las muestras se analizaron con el sistema MAGPIX™ (Luminex).

3.7. Análisis estadístico

En este trabajo, se representan los resultados en forma de tablas, de gráficos de barra con media $\pm$ SEM y/o gráfico violín que muestran la dispersión de los datos, siendo el valor de la mediana la raya central y/o los cuartiles del 25 y 75 % las rayas extra que distribuyen los resultados alrededor de la mediana. Cada punto representa a un sujeto y cada sujeto tiene un color identificativo. El análisis y la representación gráfica de los datos se realizaron con el software GraphPad Prism versión 8.0.1, utilizado también para el análisis estadístico. Se realizó primero el test de Normalidad y distribución lognormal para elegir dependiendo de su distribución ensayos one-way ANOVA, test RM one-ANOVA, test Ordinary one-way ANOVA y test Brown-Forsythe and Welch ANOVA (cuando los datos siguen una distribución normal); o bien test Kruskal-Wallis y test Friedman (test no paramétricos para datos que no siguen una distribución normal).

4. Resultados.

4.1. Selección de muestra poblacional.

Se obtuvieron muestras de 10 donantes control y de 8 pacientes con DT1, de los cuáles se recogieron parámetros antropométricos como sexo, edad e índice de masa corporal (IMC) (Tabla 7). En el grupo de pacientes con DT1, se recogieron además los parámetros clínicos relacionados con la enfermedad, como tiempo desde el debut, fecha de diagnóstico clínico, porcentaje de hemoglobina glicada (HbA1c) y la presencia de 2 autoanticuerpos relacionados con la autoinmunidad pancreática como son Anti-GAD y Anti-IA2 (Tabla 8).

Nº Identificación	Sexo	Edad	IMC
P0001	M	77	21,8
P0002	M	39	19,7
P0003	M	34	20,5
P0004	V	39	26,2
P0005	V	44	25,4
P0006	V	26	26,5
P0007	M	32	22,4
P0008	M	32	22,4
C0001	M	46	25,3
C0002	V	43	25,0
C0003	M	25	20,0
C0004	V	24	28,7
C0005	V	43	25,0
C0006	M	46	25,3
C0007	V	24	26,1
C0008	M	24	18,1
C0009	M	22	22,2
C0010	V	40	27,0

Tabla 7. Parámetros antropométricos recogidos de los controles y pacientes con DT1. En esta tabla se reflejan los parámetros de sexo, edad e índice de masa corporal de los sujetos participantes del estudio. El grupo de pacientes está señalado por los números de identificación P seguido del número de paciente y el grupo de controles está señalado por los números de identificación C seguido del número de paciente control. IMC: índice de masa corporal.

Nº Identificación	Tiempo desde el debut	HbA1c (fecha de la medición,%)	Autoanticuerpos (U/mL)	
			Anti-GAD	Anti-IA2
P0001	64 meses	7,3 (Mayo 2024)	> 280	<5
P0002	49 meses	8,4 (Mayo 2024)	> 280	> 280
P0003	93 meses	7,2 (Mayo 2024)	> 120	<5
P0004	98 meses	7,6 (Mayo 2024)	37	<5
P0005	116 meses	8,1 (Mayo 2024)	80	<5
P0006	93 meses	6,7 (Mayo 2024)	>120	>200
P0007	276 meses	6,3 (Febrero 2025)	52	<5
P0008	276 meses	6,3 (Febrero 2025)	52	<5

Tabla 8. Parámetros relacionados con la DT1 recogidos de los pacientes. Se refleja el tiempo desde el debut, así como la hemoglobina glicada (HbA1c) más próxima a la recogida de sangre determinada en porcentaje (%). También se refleja el índice de autoanticuerpos medidos en los pacientes, recogiendo datos de los autoanticuerpos Anti-GAD y Anti-IA2 determinados en U/mL.

Como ya se ha mencionado anteriormente en la Introducción, existen otros autoanticuerpos contra las células de los islotes, como el anti-insulina y el anti-ZnT8A. Sin embargo, en clínica generalmente se solicitan más a menudo el anti-GAD y el anti-IA2. Muchos estudios clínicos confirman que el anti-GAD es el autoanticuerpo que más prevalencia tiene y el mejor detector de DT1 en adultos (34,35), siendo por esto el recomendado por la American Diabetes Association y la European Diabetes Association como el primero a estudiar.

Por otro lado, el anti-IA2 es el siguiente autoanticuerpo que más prevalencia presenta, siendo por esto un buen indicador de la autoinmunidad pancreática, aunque predomina en edad pediátrica y se va reduciendo en la edad adulta. La combinación de estos dos autoanticuerpos es la más frecuentemente encontrada en los pacientes con DT1 (35,79) y, por esta razón, se usan estos dos marcadores para el diagnóstico.

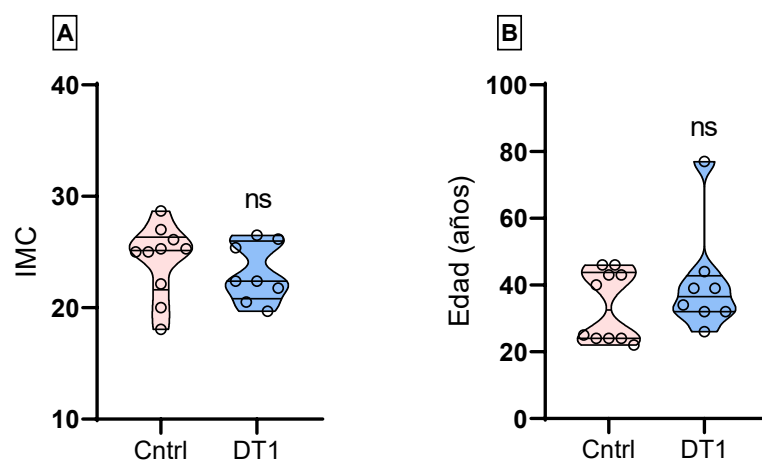


Figura 9. Comparativa del (A) índice de masa corporal (IMC) y (B) edad, entre pacientes con DT1 y controles. Los resultados muestran los valores de índice de masa corporal y edad de cada sujeto, contando con 10 sujetos donantes control y 8 pacientes con DT1. Se manifiestan en forma de gráfica de violín, y el test utilizado para realizar la estadística fue unpaired t-test; ns: no significativo.

Al recopilar la edad (Figura 9A) y los IMC (Figura 9B), no se encontraron diferencias significativas en los valores de estos dos parámetros entre el grupo de sujetos controles y el grupo de pacientes con DT1. Aunque no hubo diferencia significativa, es interesante

notar que un sujeto debutó con DT1 a edad avanzada, cerca de los 71 años (Tablas 7 y 8; Figura 9B).

4.2. Niveles de péptido C menores en pacientes con DT1 que en controles.

El péptido C sirve de marcador clínico para estimar la función de las células β del páncreas debido a que este péptido es un producto del procesamiento de la insulina endógena y se co-secreta de forma equimolar (80). Al evaluar ambos grupos los niveles de péptido C, se observó que en el grupo control, los valores se encontraron dentro del rango normal, es decir, entre 0,3 a 3,3 ng/mL en plasma. Los resultados mostraron que en el grupo control se midieron niveles de péptido C de $0,47 \pm 0,02$, mientras que en el grupo de pacientes los niveles fueron de $0,16 \pm 0,02$. Se vio que, en el grupo de pacientes, aunque aún presentaban niveles de péptido C detectables, estos significativamente 2,9 veces menores que en el grupo control, denotando la deficiencia de liberación de insulina en este grupo (Figura 10).

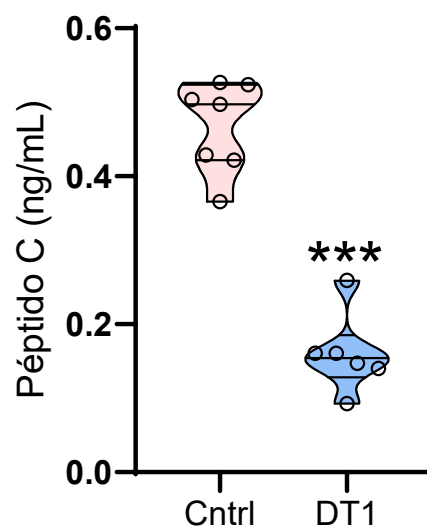


Figura 10. Niveles de péptido C en plasma de sujetos control y pacientes con DT1. Se midieron los niveles de péptido C en plasma de pacientes y controles mediante ensayo Multiplex. Los resultados muestran las concentraciones de péptido C en ng/ml en 7 sujetos del grupo control y 6 sujetos del grupo de DT1. Se manifiestan como gráfico de violín; y la estadística se realizó con un unpaired t-test; *** $p < 0,001$ en comparación el grupo de controles frente al grupo de pacientes con DT1.

4.3. Deucravacitinib y Baricitinib disminuyen la expresión de ISGs en presencia de IFN α en PBMCs.

En los últimos años, se ha visto que los IFNs tipo I parecen tener un papel importante en las etapas iniciales de la DT1 (8). Además, se ha propuesto que la inhibición de la vía JAK-STAT es una buena estrategia en la DT1 como tratamiento adyuvante, dado su papel central en la patogénesis de la enfermedad. Hay evidencia tanto clínica como preclínica de inhibidores de esta ruta para otras enfermedades autoinmunes e incluso para la DT1 con resultados prometedores (67,71,75,81).

Para evaluar si el tratamiento con los inhibidores propuestos, deucravacitinib y baricitinib, son capaces de disminuir la vía del IFN tipo I, se pretrataron las células con ambos inhibidores y, posteriormente, se trataron con IFN α durante 24 h. Una vez finalizado el tratamiento, se analizó la expresión de genes estimulados por esta citoquina.

Primero, se miró la expresión de *MX1*, que es un gen que participa en la respuesta frente a infecciones virales (Figura 11).

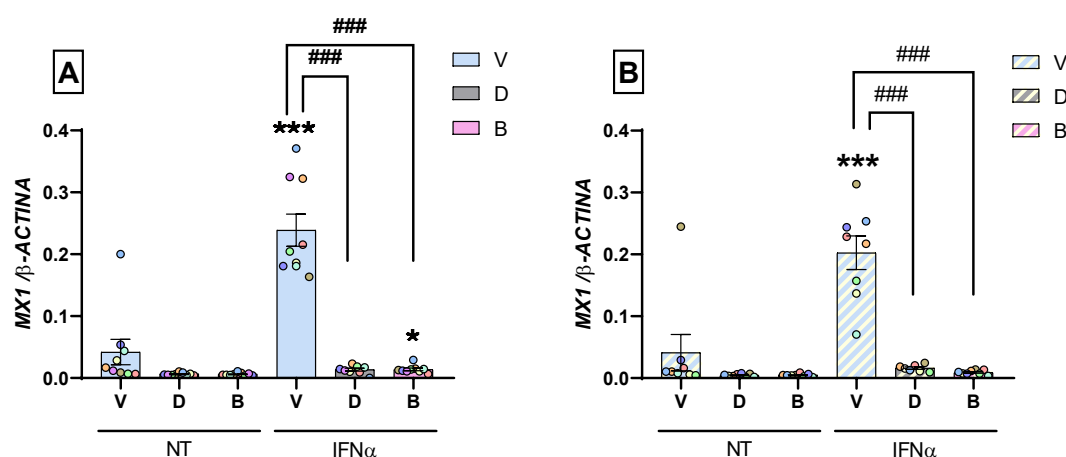


Figura 11. Efecto de los inhibidores, deucravacitinib y baricitinib, en la expresión génica de *MX1* en PBMCs expuestos a IFN α . (A) Grupo control. (B) Grupo de pacientes con DT1. Las células fueron pretratadas con vehículo (V, barras azules), con deucravacitinib 1 μ M (D, barras grises) o con baricitinib 5 μ M (B, barras rosas) durante 24 horas. Posteriormente, se trataron, o no, con IFN α (2000 U/ml) durante 24 horas. Cada círculo de color representa a un sujeto. Se muestra la expresión de *MX1* normalizada por β -*ACTINA* analizados por qPCR. Los resultados son medias $\pm$ SEM de 9 (A) y 8 (B) sujetos independientes (cada color es un sujeto). *** $p < 0,001$ entre tratamientos y controles no tratados (NT vs IFN α); ### $p < 0,001$ entre vehículo y tratamiento con deucravacitinib o baricitinib (como indican las líneas). RM one-ANOVA and Ordinary one-way ANOVA.

Se observó que tanto el grupo control como el grupo con DT1 presentaron un aumento en la expresión del gen *MX1* en respuesta a IFN α . En el grupo control, los niveles de

expresión pasaron de $0,04 \pm 0,02$ (condición basal) a $0,24 \pm 0,03$ tras la estimulación con IFN α , lo que representa un incremento de 5,7 veces respecto del control sin tratar (Figura 11A). En el grupo de pacientes con DT1, los valores aumentaron de $0,04 \pm 0,03$ a $0,20 \pm 0,03$, correspondiente a una estimulación de 4,9 veces (Figura 11B).

Tras el pretratamiento con los inhibidores, tanto el grupo control como el grupo con DT1 presentaron una inhibición de la expresión del gen *MX1* inducida por IFN α del 94% y 92%, respectivamente, tras el tratamiento con deucravacitinib. Por su parte, el pretratamiento con baricitinib redujo la expresión de *MX1* inducida por IFN α en un 94% en donantes control y en un 96% en pacientes con DT1 (Figura 11).

Al comparar la expresión de *MX1*, no se observaron diferencias significativas entre vehículo e inhibidores en ausencia de tratamiento con IFN α .

Nuestro próximo paso fue evaluar un gen de respuesta a IFN α que fuera marcador de la inflamación. Para eso, se analizó la expresión génica de *CXCL10*, el gen que codifica la quimiocina de mismo nombre que se encarga principalmente de reclutar linfocitos Th1, monocitos y células NK a los tejidos donde hay inflamación con un papel relevante en el desarrollo de la DT1 (72) (Figura 12).

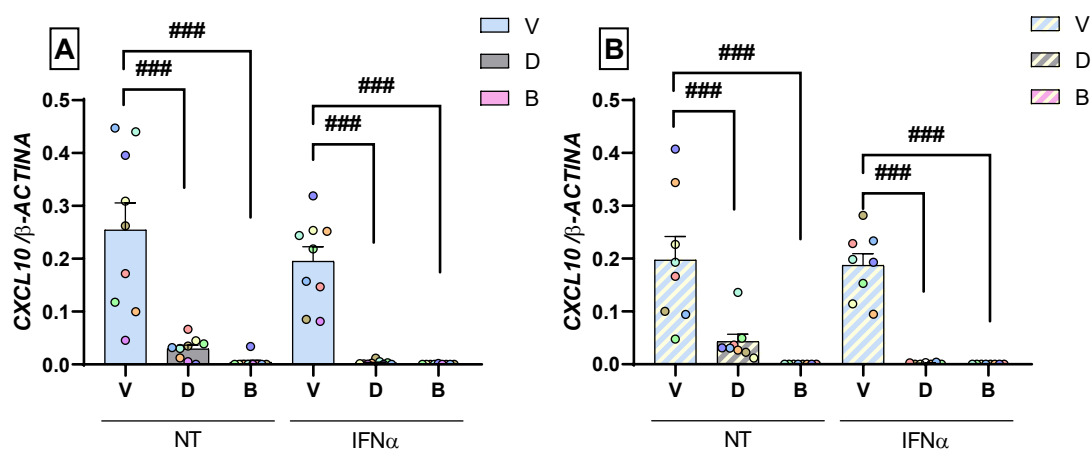


Figura 12. Efecto de los inhibidores, deucravacitinib y baricitinib, en la expresión génica de *CXCL10* en PBMCs expuestos a IFN α . (A) Grupo control. (B) Grupo pacientes con DT1. Las células fueron pretratadas con vehículo (V, barras azules), con deucravacitinib 1 μ M (D, barras grises) o con baricitinib 5 μ M (B, barras rosas) durante 24 horas. Posteriormente, se trataron, o no, con IFN α (2000 U/ml) durante 24 horas. Cada círculo de color representa a un sujeto. Se muestra la expresión de *CXCL10* normalizada por β -ACTINA analizados por qPCR. Los resultados son medias $\pm$ SEM de 9 (A) y 8 (B) sujetos independientes (cada color es un sujeto). ### $p < 0,001$ entre vehículo y tratamiento con deucravacitinib o baricitinib (como indican las líneas), test ordinary one-way ANOVA.

Al comparar las expresiones de *CXCL10* entre los donantes del grupo control y los pacientes con DT1, no se apreciaron diferencias entre significativas, ni en condiciones basales ni tras el tratamiento con IFN α (Figura 12).

Se observó que, tanto el grupo control como el grupo de pacientes DT1, no se produjo una estimulación de la expresión del RNAm de *CXCL10* en respuesta al IFN α . En el caso del grupo control, los valores pasaron de $0,25 \pm 0,05$ en las PBMCs sin tratar a $0,20 \pm 0,03$ en las células tratadas con IFN α (Figura 12A). De forma similar, en el grupo de pacientes con DT1, los valores pasaron de $0,20 \pm 0,04$ en condiciones basales (NT) a $0,19 \pm 0,02$ tras el tratamiento con IFN α (Figura 12B).

A pesar de la falta de estímulo por IFN α , sí se vio una reducción significativa con el pretratamiento con deucravacitinib y con baricitinib, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con IFN α (sin estimulación). En condiciones basales, el tratamiento con deucravacitinib redujo la expresión aproximadamente en un 88% y 78 % en los donantes control y los pacientes con DT1, respectivamente. Por su parte, el tratamiento con baricitinib produjo una reducción del 98% en los donantes control y del 99% en pacientes con DT1 (Figura 12). Tras el tratamiento con IFN α , el tratamiento con deucravacitinib redujo la expresión en un 85% y 78% en los donantes control y los pacientes con DT1, respectivamente. Por su parte, el tratamiento con baricitinib produjo una reducción del 98% en los donantes control y del 99% en pacientes con DT1 (Figura 12).

Por último, se analizó la expresión de genes del complejo de histocompatibilidad de tipo I, *HLA-ABC*, los cuales están sobreexpresados en las células β durante el desarrollo de la DT1 (68) (Figura 13).

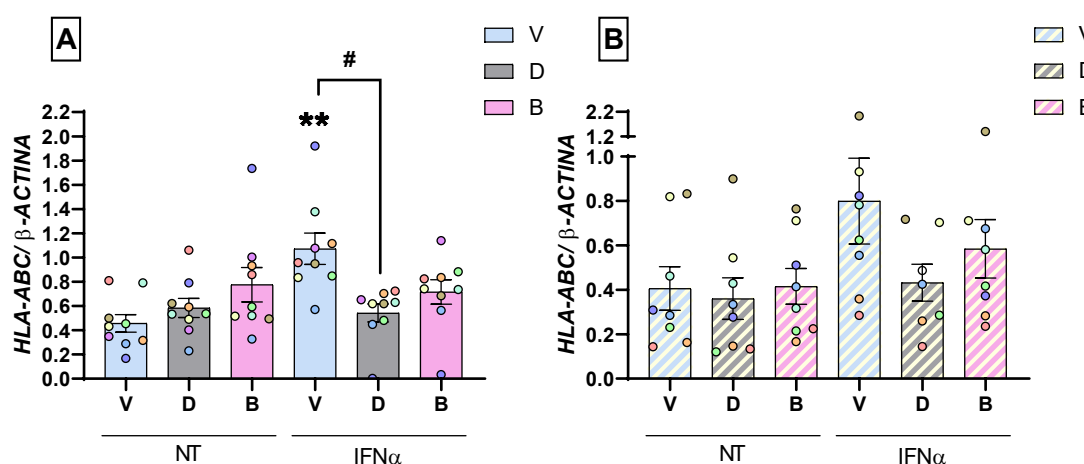


Figura 13. Efecto de los inhibidores, deucravacitinib y baricitinib, en la expresión génica de *HLA-ABC* en PBMCs expuestos a IFN α . (A) Grupo control. (B) Grupo pacientes con DT1.

Las células fueron pretratadas con vehículo (V, barras azules), con deucravacitinib 1 μ M (D, barras grises) o con baricitinib 5 μ M (B, barras rosas) durante 24 horas. Posteriormente, se trataron con IFN α (2000 U/ml) durante 24 horas. Cada círculo de color representa a un sujeto. Se muestra la expresión de *HLA* normalizada por β -*ACTINA* analizados por qPCR. Los resultados son medias $\pm$ SEM de 9 (**A**) y 8 (**B**) sujetos independientes (cada color es un sujeto). ** $p < 0,01$ tratamientos y controles no tratados (NT vs IFN α), # $p < 0,05$ entre vehículo y tratamiento con deucravacitinib o baricitinib (como indican la línea), test Kruskal-Wallis y test Brown-Forsythe and Welch ANOVA.

Se observó que tanto el grupo control como el grupo de DT1 presentaron una ligera inducción en la expresión del gen *HLA-ABC* en respuesta a IFN α . En el caso del grupo control, los valores del ARN mensajero de *HLA-ABC* pasaron de $0,46 \pm 0,07$ en condiciones basales a $1,07 \pm 0,13$ tras el tratamiento con IFN α , resultando en una estimulación de 2,35 veces con respecto del control sin tratar (Figura 13A). En el caso de los pacientes con DT1, los valores pasaron de $0,41 \pm 0,10$ (expresión basal) a $0,80 \pm 0,19$ en las células tratadas con IFN α , lo que representó una estimulación de 1,97 veces respecto al control sin tratar, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa (Figura 13B).

Curiosamente, solo el deucravacitinib, y no el baricitinib, fue capaz de reducir de forma significativa la expresión de *HLA-ABC* tras el tratamiento con IFN α , con una disminución del 49% en grupo control (Figura 13A). Sin embargo, en el grupo de pacientes con DT1, no se observaron cambios significativos relacionados al uso de ninguno de los dos inhibidores (Figura 13B).

4.4. Efecto de los inhibidores Deucravacitinib y Baricitinib en la secreción de quimiocinas en PBMCs tras el tratamiento con IFN α .

Dado que la expresión de determinados genes, como aquellos que codifican ciertas quimiocinas, puede variar en función del tiempo de exposición al tratamiento, se decidió evaluar la cantidad acumulada de quimiocinas secretadas al medio tras la estimulación a IFN α . Para ello, se midieron los niveles de CXCL10, CXCL1, CCL2 Y CCL5 por medio de un ensayo de Multiplex (Figura 14).

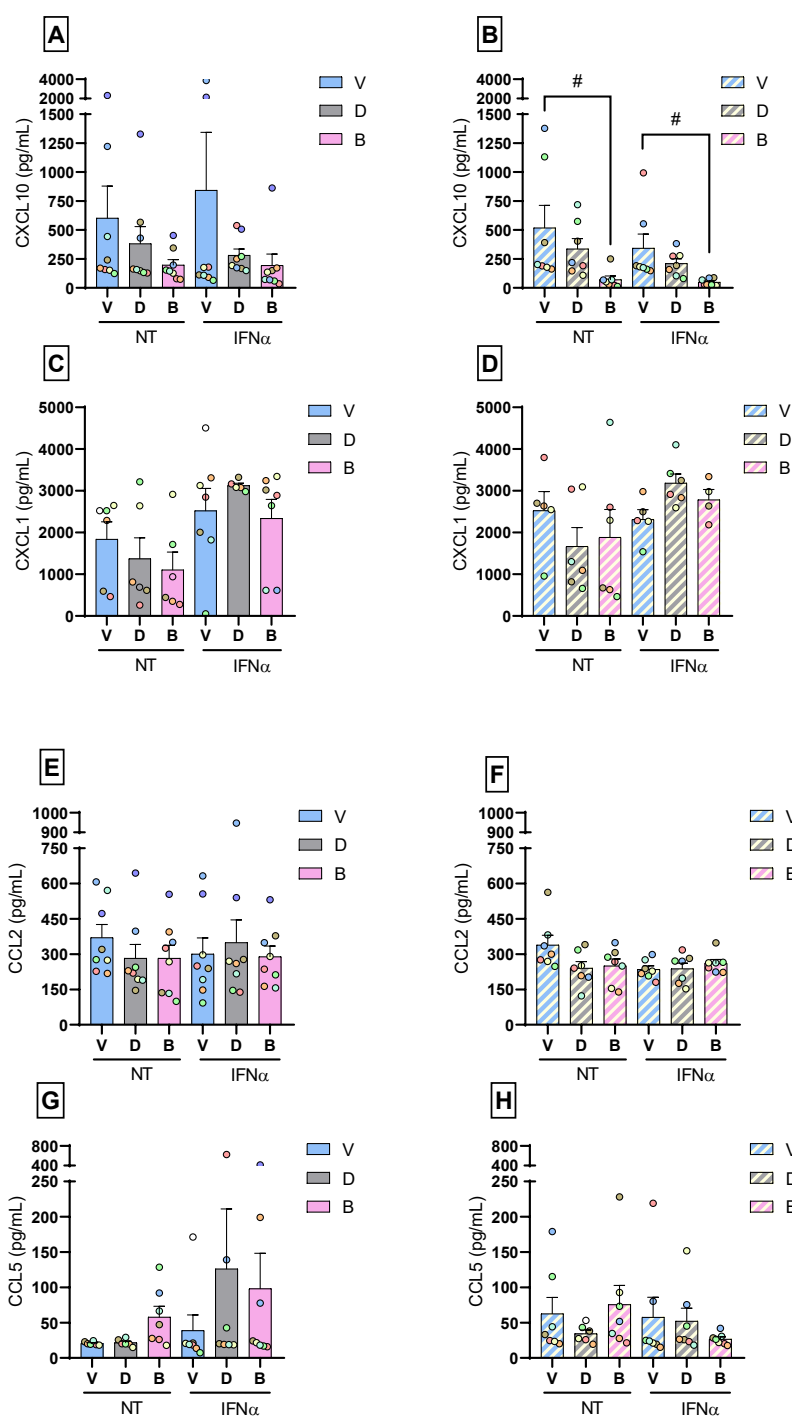


Figura 14. Efecto de los inhibidores, deucravacitinib y baricitinib, en la secreción de quimioquinas CXCL10, CXCL1, CCL2 y CCL5 en PBMCs expuestos a IFN α . (A,B) Cuantificación de la secreción de CXCL10, (C,D) CXCL1, (E,F) CCL2 y (G,H) CCL5 en pacientes del grupo control (A,C,E y G) o Grupo pacientes con DT1 (B,D,F y H). Las células fueron pretratadas con vehículo (V, barras azules), con deucravacitinib 1 μ M (D, barras grises) o con baricitinib 5 μ M (B, barras rosas) durante 24 horas. Cada círculo de color representa a un sujeto. Posteriormente, se trataron con IFN α (2000 U/ml) durante 24 horas. Los resultados muestran los niveles de CXCL10, CXCL1, CCL2 y CCL5 en pg/mL secretados al medio. Los resultados muestran las medias $\pm$ SEM de 8 y 7 sujetos control y con DT1, respectivamente; test Kruskal-Wallis, test Friedman; # p<0,05 entre vehículo y tratamiento (como indican las líneas).

Nuestros resultados muestran que no se observó una estimulación significativa en la secreción de CXCL10 en respuesta a IFN α , ni en el grupo control ni en el grupo de pacientes con DT1. En el grupo control, los niveles de CXCL10 fueron de $602,4 \pm 276,1$ pg/mL en condiciones basales y de $843,1 \pm 499,5$ pg/mL tras el tratamiento con IFN α (Figura 14A). En el grupo de pacientes con DT1, los valores fueron de $519,0 \pm 193,9$ pg/mL en la condición sin tratar y de $343,7 \pm 120,9$ pg/mL tras la exposición a IFN α (Figura 14B). En el grupo control, ninguno de los dos inhibidores fue capaz de reducir significativamente la secreción de CXCL10 (Figura 14A). En cambio, en el grupo de pacientes con DT1, el tratamiento con baricitinib indujo una reducción aproximada de la secreción de CXCL10 del 86% en comparación con el vehículo, tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con IFN α (Figura 14B).

En el caso de las quimiocinas CXCL1, CCL2 y CCL5, no se observaron diferencias significativas entre las condiciones basales y las células tratadas con IFN α , tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con DT1. Además, el tratamiento con deucravacitinib y baricitinib tampoco produjo cambios significativos en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 14C-H).

4.5. Deucravacitinib y Baricitinib disminuyen la expresión de ISGs en presencia de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica.

Se ha propuesto que el IFN γ contribuye a la progresión de la DT1, actuando como un amplificador del proceso autoinmune una vez que este ha sido iniciado (25,37).

Para evaluar si los inhibidores deucravacitinib y baricitinib eran capaces de atenuar los efectos del IFN γ , se pretrataron las células con ambos inhibidores y, posteriormente, se trataron con IFN γ durante 24 h. Finalizado el tratamiento, se analizaron los niveles de expresión de genes estimulados por esta citoquina.

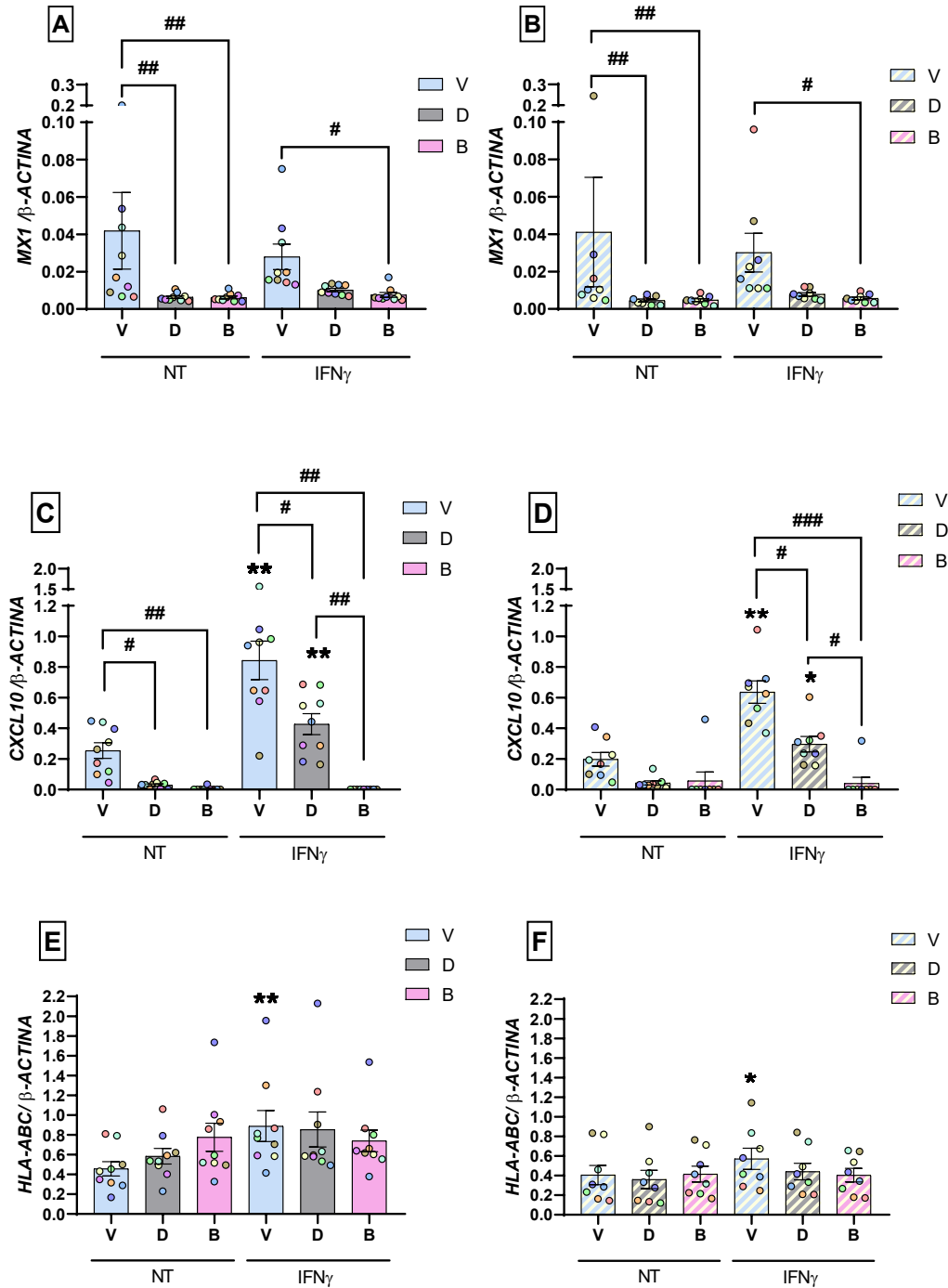


Figura 15. Efecto de los inhibidores, deucravacitinib y baricitinib, en la expresión génica de *MX1*, *CXCL10* y *HLA-ABC* en PBMCs expuestos a IFN γ . (A) Expresión génica de *MX1*, (B) *CXCL10* y (C) *HLA-ABC*, en pacientes control (A, C y E) y con DT1 (B, D y F). Las células fueron pretratadas con vehículo (V, barras azules), con deucravacitinib 1 μ M (D, barras grises) o con baricitinib 5 μ M (B, barras rosas) durante 24 horas. Posteriormente, se trataron con IFN γ (2000 U/ml) durante 24 horas. Cada círculo de color representa a un sujeto. Se muestra la expresión normalizada por β -ACTINA analizada por qPCR. Los resultados son medias $\pm$ SEM de 9 (A, C y E) y 8 (B, D y F) sujetos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ tratamientos y controles no tratados (NT vs IFN γ), # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ entre vehículo y tratamiento (como indican las líneas), test Friedman y test RM one-way ANOVA.

Los resultados mostraron que ni el grupo control ni el grupo con DT1 presentaron una estimulación de la expresión del gen *MX1* en respuesta a IFN γ (Figura 15A y B).

Se observó que, en condiciones basales, tanto deucravacitinib como baricitinib redujeron de forma significativa la expresión de *MX1* con respecto al vehículo. En el grupo control, deucravacitinib produjo una reducción aproximada del 84% y baricitinib del 85% (Figura 15A), mientras que grupo de pacientes con DT1 las reducciones fueron aproximadamente del 88% (Figura 15B). Además, se observó que el tratamiento con baricitinib disminuyó de forma significativa la expresión de *MX1* tras el tratamiento con IFN γ , con reducciones del 73% en el grupo control y del 81% en el grupo de pacientes con DT1, en comparación con las células no tratadas (Figura 15A y B).

Respecto a *CXCL10*, tanto el grupo control como el grupo con DT1 presentaron un aumento de su expresión en respuesta a IFN γ (Figura 15C y D). En el grupo control, los niveles de expresión de ARN mensajero de *CXCL10* pasaron de $0,25 \pm 0,05$ (condición basal) a $0,84 \pm 0,13$ tras la estimulación con IFN γ , lo que representa una estimulación de 3,31 veces respecto al control sin tratar (Figura 15C). En el grupo de pacientes con DT1, los valores pasaron de $0,30 \pm 0,05$ a $0,64 \pm 0,07$, lo que equivale a un aumento de 3,22 veces en comparación con la condición basal (Figura 15D).

Ambos inhibidores fueron capaces de reducir de forma significativa la expresión basal de *CXCL10* en el grupo control. Deucravacitinib produjo una reducción del 88%, mientras que el tratamiento con baricitinib llevó a una inhibición del 98%, en comparación a las células tratadas con vehículo (Figura 15C). Es importante señalar que, aunque se observó una tendencia a la inhibición de *CXCL10* por parte de deucravacitinib y baricitinib en el grupo con DT1, esta no alcanzó significación estadística (Figura 15D).

Además, tanto deucravacitinib como baricitinib redujeron significativamente la expresión de *CXCL10* inducida por IFN γ . En pacientes control, deucravacitinib produjo una disminución del 49%, y baricitinib del 100% (Figura 15C). En pacientes con DT1, las reducciones fueron del 53% con deucravacitinib y del 94% con baricitinib (Figura 15D).

Finalmente, al analizar la expresión de *HLA-ABC*, se observó que tanto el grupo control como el grupo con DT1 presentaron una inducción de la expresión del *HLA-ABC* en respuesta a IFN γ (Figura 15E y F). En el grupo control, la expresión aumentó 1,94 veces respecto del control sin tratar (de $0,46 \pm 0,07$ a $0,89 \pm 0,16$) (Figura 15E), mientras que en el grupo con DT1 el incremento fue de 1,40 veces (de $0,41 \pm 0,10$ a $0,57 \pm 0,11$) (Figura 15F). Sin embargo, el tratamiento con deucravacitinib y baricitinib no produjo

diferencias significativas, ni en condiciones basales ni tras el tratamiento con IFN γ (Figura 15E y F).

4.6. Efecto de los inhibidores Deucravacitinib y Baricitinib en la secreción de quimiocinas en PBMCs tras el tratamiento con IFN γ .

Con respecto a CXCL10, no se observó una estimulación de su secreción en respuesta a IFN γ , ni en el grupo control ni en el grupo de DT1 (Figura 16A y B). En el grupo control, los niveles de secreción pasaron de $602,4 \pm 276,1$ pg/mL a $786,9 \pm 457,0$ pg/mL (Figura 16A). En cambio, en el grupo con DT1, se observó una disminución (de $519,0 \pm 193,9$ pg/mL a $182,2 \pm 46,16$ pg/mL) tras la estimulación con IFN γ , aunque esta no fue estadísticamente significativa.

En el grupo control, baricitinib redujo de forma significativa la secreción de CXCL10 en un 78% tras el tratamiento con IFN α (Figura 16A). Además, se observó una diferencia significativa del 79% entre los tratamientos con deucravacitinib y baricitinib (Figura 16A). En el grupo de pacientes con DT1, el tratamiento con deucravacitinib produjo una reducción aproximada del 86% en la secreción de CXCL10 en comparación al vehículo (Figura 16B). Asimismo, en células tratadas con IFN γ , la secreción se redujo en un 48% con deucravacitinib en comparación con baricitinib (Figura 16B).

Para las quimiocinas CXCL1, CCL2 y CCL5, no se observaron diferencias significativas en los niveles de secreción entre la condición basal y la estimulada con IFN γ , ni en el grupo control ni en el grupo con DT1. Asimismo, el tratamiento con deucravacitinib o baricitinib no produjo cambios significativos en ninguna de las condiciones. Tampoco se encontraron diferencias relevantes entre ambos grupos (Figura 16C-H).

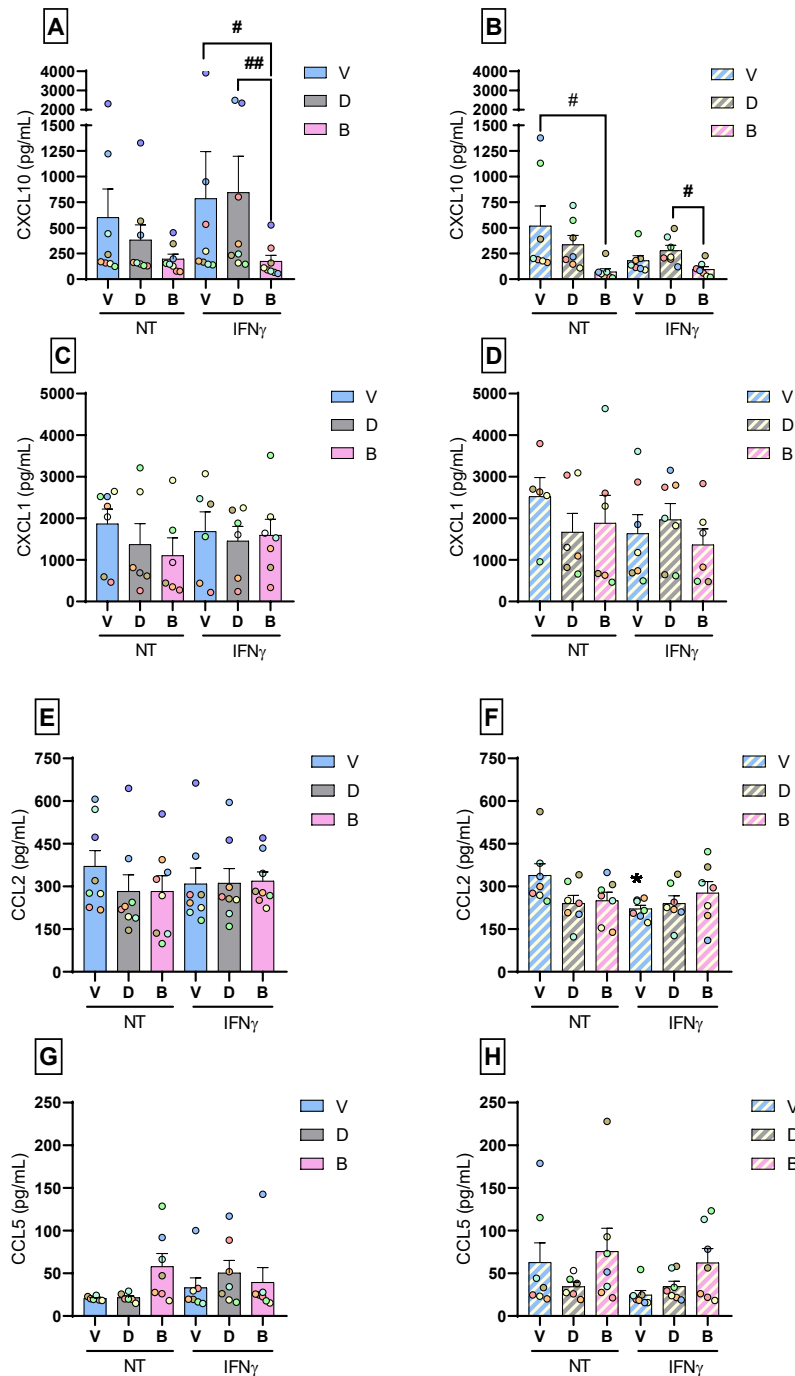


Figura 16. Efecto de los inhibidores, deucravacitinib y baricitinib, en la secreción de quimioquinas CXCL10, CXCL1, CCL2 y CCL5 en PBMCs expuestas a IFN γ . (A, B) Cuantificación de la secreción de CXCL10, (C, D) CXCL1, (E, F) CCL2 y (G, H) CCL5 en pacientes del grupo control (A, C, E, y G) o Grupo pacientes con DT1 (B, D, F y H). Las células fueron pretratadas con vehículo (V, barras azules), con deucravacitinib 1 μ M (D, barras grises) o con baricitinib 5 μ M (B, barras rosas) durante 24 horas. Posteriormente, se trataron con IFN γ (2000 U/ml) durante 24 horas. Los resultados muestran los niveles de CXCL10, CXCL1, CCL2 y CCL5 en pg/mL secretados al medio. Los resultados muestran las medias $\pm$ SEM de 8 y 7 sujetos control y con DT1, respectivamente. * $p < 0,05$ tratamientos y controles no tratados (NT vs IFN γ); # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ entre vehículo y tratamiento (como marcan las líneas), test Kruskal-Wallis y test Brown-Forsythe and Welch ANOVA.

6. Discusión

En este proyecto se han evaluado los efectos de dos inhibidores de las proteínas de la familia JAK, deucravacitinib y baricitinib, sobre la acción de las citoquinas proinflamatorias IFN α e IFN γ en PBMCs de donantes controles y pacientes con DT1.

Durante la selección de los pacientes, se recogieron datos antropométricos como edad, IMC y sexo de todos los sujetos participantes del estudio. De forma general, estos datos sugieren que el grupo de donantes es bastante homogéneo, ya que no se identificaron diferencias significativas en la edad, el IMC ni el sexo entre los grupos comparados.

En cuanto a los niveles plasmáticos de péptido C, se observó que los sujetos del grupo control presentaron valores dentro del rango normal, mientras que los pacientes con DT1 mostraron concentraciones significativamente menores. Esta diferencia refleja una secreción endógena de insulina reducida y, por tanto, una función residual limitada de las células β en este grupo.

Para evaluar el efecto de los inhibidores de JAK, se analizó de dos manera diferentes: por un lado, se midió la expresión génica de ISGs, y, por otro lado, se midió la secreción de varias quimiocinas proinflamatorias. En la figura 17 se detallan de manera resumida los resultados obtenidos durante este estudio, que se van a discutir a continuación.

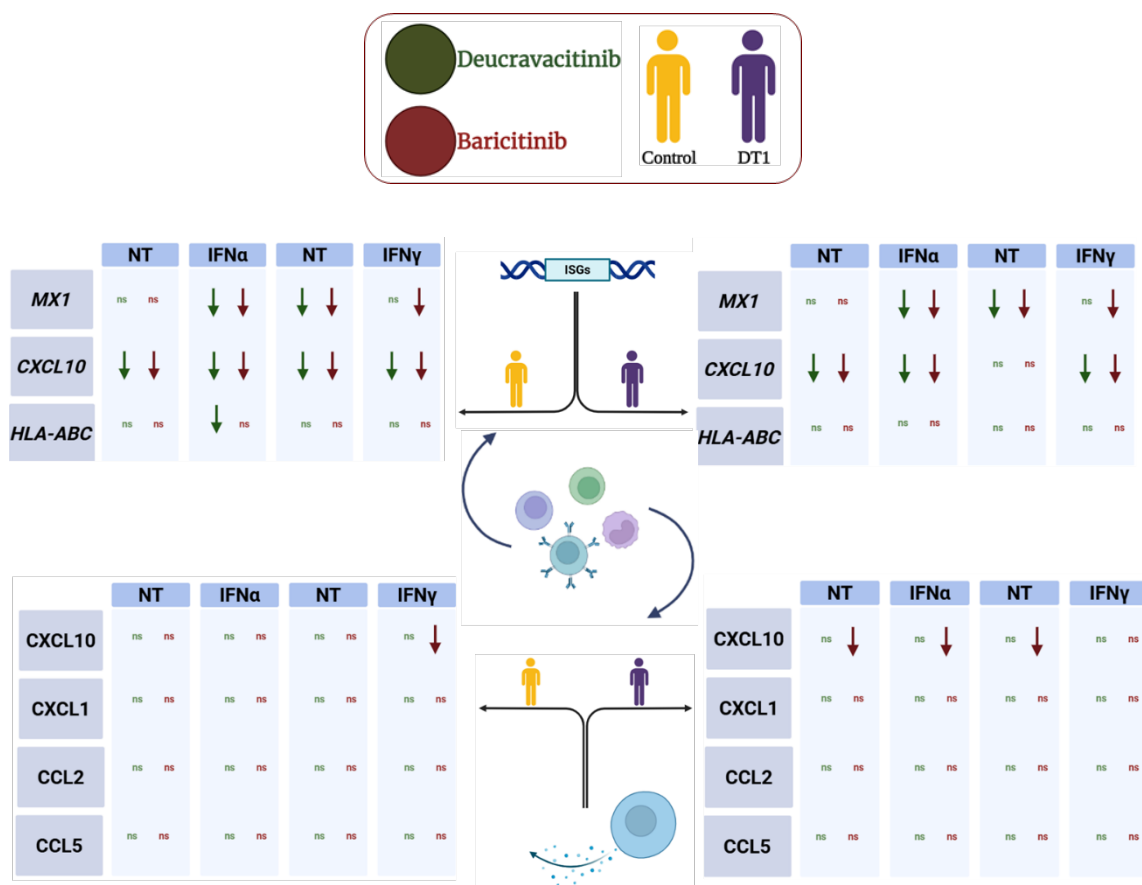


Figura 17. Resumen simplificado de los resultados obtenidos en este proyecto. En los paneles superiores se muestran los resultados obtenidos del análisis de la expresión génica de ISGs, mientras que en los paneles inferiores se muestran los resultados de la secreción de citoquinas, ambos siguiendo el orden de izquierda controles y derecha pacientes con DT1. Las flechas representan los cambios significativos y la dirección de esos cambios (deucravacitinib en rojo y baricitinib en verde), ns indica que los cambios no fueron estadísticamente significativos.

En primer lugar, se midió la expresión de los ISGs *MX1*, *CXCL10* y *HLA-ABC* en células tratadas o con IFN tipo I o IFN tipo II. Según la literatura, los IFN tipo I participan activamente en las etapas tempranas de la DT1, mientras que los IFN tipo II están más implicados en la progresión de la enfermedad (8).

Con respecto al gen *MX1*, el cual codifica para una proteína clave en la defensa antiviral innata llamada Mx1 (82), los resultados muestran que su expresión tras estimular con IFN α aumentó de manera significativa tanto en controles como en pacientes con DT1 crónica. Esto está de acuerdo con estudios previos, donde *MX1* ha sido caracterizado como un ISG activado preferentemente por IFNs tipo I, pero en menor medida por interferones de tipo II (37,82). Si nos centramos en el efecto tras el tratamiento con los inhibidores deucravacitinib y baricitinib, los resultados muestran una reducción significativa tras el uso de ambos en la expresión génica de *MX1*, tras el tratamiento con IFNs tipo I y II e incluso en condiciones basales. Esto concuerda con la literatura previa, ya que tanto en resultados anteriores por nuestro grupo en células β pancreáticas humanas EndoC- β H1 y en estudios en PBMCs/sangre total humana (66,75,83,84), se ha visto una reducción de la expresión de *MX1* tras el tratamiento con estos inhibidores a concentraciones similares a las usadas en este trabajo.

En el caso de *CXCL10*, este codifica para una quimiocina del mismo nombre, responsable de la atracción de linfocitos T, células NK y dendríticas, siendo clave en la respuesta inflamatoria durante la DT1 (85–87). Los resultados muestran que la expresión de este gen se indujo principalmente por IFN γ y no por IFN α . En el caso de la estimulación observada por IFN γ , que es un IFN tipo II, esto se mantiene consistente con la literatura ya que existe evidencia sólida de que el gen *CXCL10* es inducida por esta citoquina (85,87,88). Pero, el hecho de que no se induzca la expresión de *CXCL10* tras el tratamiento con IFN α no concuerda con evidencias bien establecidas en la bibliografía, en donde se ha descrito la inducción de la expresión en diferentes líneas celulares bien en PBMCs o en célula β (66,75). Esta falta de efecto, podría deberse a diferentes motivos como el tiempo de exposición a IFN α (66,86), la heterogeneidad intrínseca de las PBMCs (89) y la posibilidad de que las condiciones de cultivo ya muestren unos niveles de expresión basales que enmascaren la estimulación de este

gen (83). Respecto a la respuesta obtenida tras el tratamiento con los inhibidores, se observa que la reducción de la expresión de *CXCL10* tras el tratamiento con deucravacitinib alrededor de la mitad que la obtenida con baricitinib. La reducción casi total observada con baricitinib concuerda con la literatura, ya que este inhibidor es de la vía JAK-STAT inhibiendo proteínas JAK1/JAK2, y por tanto el hecho de que el gen *CXCL10*, que se regula principalmente por esta vía, está muy inhibido (37,66,67). Sin embargo, la respuesta parcial de *CXCL10* a deucravacitinib, difiere de resultados obtenidos en otras líneas celulares como célula β y células inmunes donde si se ve esa reducción total pese a que TYK2 contribuye menos a la expresión de este gen (66,75). Este hallazgo podría deberse a esa preferencia por una ruta u otra, ya que se ha visto que deucravacitinib, al contrario que baricitinib y otros inhibidores de JAK generales, no altera la fosforilación de STAT1 inducida por IFN γ (64,66,68,75). En conjunto, y teniendo en cuenta la literatura, es posible que deucravacitinib a pesar de no inhibir de manera directa la ruta de IFNs tipo II, se ha visto que en líneas celulares de célula β el uso de IFN γ + IL-1 β si inhibe la expresión, lo que sugiere que el deucravacitinib aunque se esperaría que no hubiera reducción esperable de *CXCL10*, sí que podría estar modulando esa reducción parcial por medio de otros mecanismos indirectos que activen de forma autocrina la vía JAK1/TYK2 de expresión de *CXCL10* (66,75).

Estos resultados enfatizan como de importante es utilizar inhibidores según el objetivo terapéutico que busquemos, ya que en el caso de *CXCL10* por ejemplo, baricitinib al ser un inhibidor más amplio es más eficaz, pero genera una inhibición total mientras que el deucravacitinib siendo un inhibidor selectivo de TYK2 puede ser más específico y no inhibir completamente.

Por último, respecto a *HLA-ABC*, se observa que la expresión es estimulada tanto por IFN α e IFN γ . Sin embargo, esta estimulación es menor y con mayor dispersión que la del resto de marcadores de inflamación (*MX1* o *CXCL10*), posiblemente debido a una mayor variabilidad intrínseca de expresión interindividual de este marcador. Cabría esperar una mayor expresión basal de *HLA-ABC* en pacientes con DT1 que en los controles debido a la exposición prolongada a citoquinas proinflamatorias y estrés inmunitario (90,91), sin embargo en nuestro grupo muestral eso no ocurre, partiendo ambos grupo de una expresión similar. Esto se debe, muy probablemente, a que los pacientes con DT1 usados en este estudio debutaron con diabetes con una media de 133 ± 90 meses de media (más o menos 10 años) lo que los clasifica entre etapa 3 de larga duración y etapa 4 de la enfermedad (16,18), y está ampliamente descrito en la bibliografía que estos marcadores están más elevados cuando mayor es su proximidad al debut, es decir, etapa 2 o recién debutado en la etapa 3 (83,84).

Por otro lado, el deucravacitinib reduce de manera significativa la expresión de *HLA-ABC* en el grupo control tratado con IFN α de una forma más robusta que el baricitinib, cuya reducción no fue significativa, posiblemente por la gran dispersión de los datos en nuestra población. Si nos dirigimos a la literatura, se ha visto que ambos inhibidores son capaces de reducir la expresión de este gen, en líneas estables de células beta humanas (EndoC- β H1) o en PBMCs (66,75), lo que concuerda parcialmente con los resultados que hemos obtenido en este trabajo.

A modo de resumen de esta primera parte, podemos concluir que la expresión de *MX1* y de *CXCL10* pueden ser unos buenos marcadores para la evaluación de inhibidores de las rutas de IFN en PBMCs, mientras que la expresión de *HLA-ABC* presenta una mayor dispersión entre la población que dificulta el análisis de los datos y la obtención de datos concluyentes basados en este marcador.

Para completar la evaluación de los inhibidores, se midió la secreción al medio de quimioquinas proinflamatorias, más concretamente CXCL10, CXCL1, CCL2 y CCL5 bajo las mismas condiciones experimentales que se usaron en los experimentos de expresión génica: tras el tratamiento con IFN α e IFN γ en presencia o ausencia de los inhibidores.

Por un lado, CXCL10 y CXCL1 son quimiocinas que pertenecen a la familia CXC y tienen una función quimioatrayente de neutrófilos y linfocitos. CXCL10 tiene una función centrada principalmente en la inflamación local de los islotes durante la progresión de la DT1, reclutando linfocitos Th. CXCL1 induce la migración de neutrófilos al sitio inflamado y promueve la angiogénesis asociada a la inflamación pancreática. Por otro lado, CCL2 y CCL5 son quimiocinas que pertenecen a la familia CC las cuáles son también quimioatrayentes, pero en este caso de monocitos y otras células sistema inmune principalmente. CCL2 actúa reclutando monocitos, macrófagos y linfocitos T, además de que facilita la infiltración de monocitos perpetuando la inflamación. CCL5 también recluta linfocitos T y está asociada a la infiltración linfocitaria y el daño en las células β (92–96).

En cuanto a la secreción de CXCL10, los resultados muestran que no hay estimulación tras el tratamiento con IFN α o IFN γ . Este hallazgo contrasta con lo reportado en otras líneas celulares como PBMCs y células β de pacientes con DT1 reciente o en otras enfermedades autoinmunes, donde se observa que si hay una inducción clara de CXCL10 (85,89). En el grupo de pacientes con DT1, este hecho podría explicarse en que las PBMCs de pacientes con DT1 crónico ya presentan unos niveles de preactivación basal altos, que limitan la capacidad de estas células de responder a

estímulos adicionales. Si nos vamos a la literatura, existen estudios que explican este fenómeno de adaptación a la exposición crónica a IFNs (83,84), que explicarían la falta de respuesta esperada. Otra posible explicación, es el tiempo de exposición, nosotros hemos basado nuestros estudios en los resultados previos obtenidos por nuestro grupo en células humanas EndoC- β H1 en donde la secreción máxima se alcanza tras las 24 h tras el estímulo (75). Otros autores han descrito cinéticas diferentes para esa secreción máxima en sangre periférica, por ejemplo, Burke y colaboradores han descrito que se alcanza la secreción máxima de esta quimioquina tras 24 h tras la estimulación con IFN α (1000 U/ml) (66). Si nos centramos en el efecto de los inhibidores, los resultados muestran un efecto inhibitorio significativo del baricitinib tras el tratamiento con IFN γ y con IFN α tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con DT1, mientras que deucravacitinib produjo una tendencia no significativa tras el tratamiento con IFN α , pero sin efectos tras la exposición a IFN γ . Estos hallazgos respaldan la idea de que la inhibición de JAK1/JAK2 ejerce un efecto más potente sobre la señalización inflamatoria que la inhibición selectiva de TYK2, sugiriendo esa regulación preferente de CXCL10 por JAK1/JAK2 (66).

Respecto a las otras quimiocinas, los resultados no muestran resultados significativos, observando que CXCL1 y CCL5 se mantenían ligeramente elevados en el grupo de pacientes con DT1 y CCL2 se mantiene muy similar entre ambos grupos, sin variaciones aparentes tras la estimulación con IFNs o tras el tratamiento con inhibidores.

La secreción de CXCL1 puede estar significativamente más alta en pacientes con DT1 que en controles (95,96), algo que no se observa en nuestros resultados, aunque también existe una gran dispersión entre ellos. Además, hay evidencia de que CXCL1 es proinflamatoria y participa en la patogénesis de la DT1, siendo inducida por citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β y en menor medida interferones (95,96), por lo que cabría esperar una estimulación en la secreción de esta quimioquina, algo que sí se ha visto en otras enfermedades autoinmunes (89). Existen varias explicaciones a esta falta de inducción; por un lado, esta falta de estimulación puede deberse a diferencias en la población de las PBMCs ya la presencia de las poblaciones celulares a las que se asocia esta quimioquina, monocitos y neutrófilos, en la sangre periférica puede ser muy variable (94); por otro lado, puede darse que los niveles basales de CXCL1 en PBMCs sean bajos en las condiciones de cultivo utilizadas, siendo necesario otros estímulos inflamatorios como TNF- α e IL-1 β que indujeran en mayor medida la secreción (85,90). Tampoco, se ha visto efecto por el tratamiento con los inhibidores, algo que puede deberse a que CXCL1 no es un gen clásico inducido por interferones y dependería en mayor medida por otras rutas de señalización diferentes (86,95,96).

Por último, hay evidencias que CCL2 y CCL5 participan en la patogénesis de la DT1, particularmente en el reclutamiento de monocitos y linfocitos T (92,94,95). Nuestros resultados no muestran que haya estimulación por IFNs tipo I o II, ni tampoco efectos de los inhibidores deucravacitinib y baricitinib en la secreción de estas quimiocinas a las concentraciones y tiempos usados en este estudio. En estudios realizados con pacientes con DT1 y LADA (94), si se ve un incremento en la secreción de estas quimiocinas, por ejemplo Ooms y colaboradores han descrito que se alcanza la secreción máxima de CCL2 y CCL5 en PBMCs aislados tras 40 h de incubación con phorbol–myristate–acetate/ionomycin (PMA/I) (200 pg/ml) (94). Una explicación factible es que CCL2 y CCL5 no dependen exclusivamente de las rutas clásicas de IFNs, sino que son inducibles por otros estímulos inflamatorios más potentes como TNF- α e IL-1 β , señalizando por medio de vías como NF- κ B y MAP-K, y por tanto no se ve esa inducción esperable (94–98).

A modo de resumen de esta segunda parte, podemos concluir que la secreción de quimioquinas es mucho más variable y menos evidente que la expresión génica para la evaluación de la inflamación causada por la DT1 y la evaluación de terapias con inhibidores de la ruta del IFN que la expresión génica en PBMCs. En cualquier caso, de entre las quimioquinas testadas CXCL10 puede ser un buen marcador de inflamación para la evaluación de inhibidores de las rutas de IFN en PBMCs, descartando CXCL1, CCL5 y CCL2, al menos bajo estas condiciones.

7. Conclusiones.

En este trabajo de fin de máster se ha evaluado la utilidad de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) como modelo in vitro para el estudio del tratamiento con inhibidores, concretamente deucravacitinib y baricitinib, en sujetos control y en pacientes con DT1, tras la exposición a IFN de tipo I y II. Este enfoque ha permitido valorar la respuesta diferencial a dichos fármacos en un contexto de estimulación inmunitaria, aportando información relevante sobre su potencial aplicación en el manejo de la DT1. Además, los resultados obtenidos refuerzan el valor de los ensayos in vitro con PBMCs como herramienta para predecir la eficacia de diferentes tratamientos y avanzar hacia estrategias de terapia personalizada en pacientes con DT1.

Las conclusiones a las que se ha llegado tras este estudio son:

1. La expresión génica en PBMCs, en particular de *MX1* y *CXCL10*, se confirma como un marcador sensible y fiable para evaluar la eficacia de inhibidores de las rutas de señalización de IFN en el contexto de la DT1.
2. Tanto deucravacitinib como baricitinib inhibieron de forma significativa la expresión génica de *MX1* y *CXCL10* en PBMCs, independientemente del tipo de IFN utilizado, lo que refuerza la robustez de estos genes como biomarcadores de respuesta terapéutica.
3. La expresión de *HLA-ABC*, aunque regulada por la exposición a IFNs, muestra una elevada variabilidad interindividual que limita su utilidad como marcador consistente en estudios in vitro.
4. La secreción de quimioquinas resulta ser un parámetro más heterogéneo y menos concluyente que la expresión génica para evaluar la inflamación y la respuesta a terapias inhibitoras de la ruta del IFN en PBMCs.
5. Entre las quimioquinas analizadas, *CXCL10* emerge como un marcador relevante de inflamación, mientras que *CXCL1*, *CCL5* y *CCL2* presentan una escasa fiabilidad bajo las condiciones ensayadas, lo que restringe su potencial aplicación en este modelo in vitro.
6. En el caso concreto de la secreción de *CXCL10*, se observó que baricitinib mostró un mejor rendimiento que deucravacitinib, sugiriendo diferencias en la eficacia de los inhibidores en función del parámetro analizado.

8. Bibliografía.

1. Forga L. Epidemiología en la diabetes tipo 1: ayudando a encajar las piezas del puzle. *Endocrinol Nutr* (2015) 62:149–151. doi: 10.1016/j.endonu.2015.02.002
2. IDF Diabetes Atlas 2025. *Diabetes Atlas* <https://diabetesatlas.org/resources/idf-diabetes-atlas-2025/> [Accessed June 24, 2025]
3. Type 1 Diabetes Index. *Type 1 Diabetes Index* <https://www.t1dindex.org/> [Accessed June 24, 2025]
4. Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol* (2020) 16:349–362. doi: 10.1038/s41574-020-0355-7
5. Perez-Serna AA, Guzman-Llorens D, Dos Santos RS, Marroqui L. Bcl-2 and Bcl-xL in Diabetes: Contributions to Endocrine Pancreas Viability and Function. *Biomedicines* (2025) 13:223. doi: 10.3390/biomedicines13010223
6. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *The Lancet* (2014) 383:69–82. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60591-7
7. Ferreira RC, Guo H, Coulson RMR, Smyth DJ, Pekalski ML, Burren OS, Cutler AJ, Doecke JD, Flint S, McKinney EF, et al. A Type I Interferon Transcriptional Signature Precedes Autoimmunity in Children Genetically at Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes* (2014) 63:2538–2550. doi: 10.2337/db13-1777
8. Marroqui L, Perez-Serna AA, Babiloni-Chust I, Dos Santos RS. “Type I interferons as key players in pancreatic β -cell dysfunction in type 1 diabetes.” *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier (2021). p. 1–80 doi: 10.1016/bs.ircmb.2021.02.011
9. Carré A, Vecchio F, Flodström-Tullberg M, You S, Mallone R. Coxsackievirus and Type 1 Diabetes: Diabetogenic Mechanisms and Implications for Prevention. *Endocr Rev* (2023)bnad007. doi: 10.1210/endrev/bnad007
10. Conde Barreiro S, González Pelegrín B, Quevedo Beneyto B, Feja Solana C, Malo Aznar C, Rojo-Martínez G, Menéndez Torre E, Gómez Peralta F. Estimación de la incidencia y prevalencia de la diabetes mellitus tipo 1 en menores de 15 años en España. *Endocrinol Diabetes Nutr* (2025)501591. doi: 10.1016/j.endinu.2025.501591
11. Robertson CC, Elgamal RM, Henry-Kanarek BA, Arvan P, Chen S, Dhawan S, Eizirik DL, Kaddis JS, Vahedi G, Parker SCJ, et al. Untangling the genetics of beta cell dysfunction and death in type 1 diabetes. *Mol Metab* (2024) 86:101973. doi: 10.1016/j.molmet.2024.101973
12. Erdem N, Montero E, Roep BO. Breaking and restoring immune tolerance to pancreatic beta-cells in type 1 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* (2021) 28:397. doi: 10.1097/MED.0000000000000646
13. Foulis AlanK, Farquharson MauraA, Meager A. IMMUNOREACTIVE α -INTERFERON IN INSULIN-SECRETING β CELLS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS. *The Lancet* (1987) 330:1423–1427. doi: 10.1016/S0140-6736(87)91128-7
14. Green J, Casabonne D, Newton R. Coxsackie B virus serology and Type 1 diabetes mellitus: a systematic review of published case-control studies. *Diabet Med J Br Diabet Assoc* (2004) 21:507–514. doi: 10.1111/j.1464-5491.2004.01182.x
15. Insel RA, Dunne JL, Atkinson MA, Chiang JL, Dabelea D, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Herold KC, Krischer JP, Lernmark Å, et al. Staging Presymptomatic Type 1 Diabetes: A Scientific Statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care* (2015) 38:1964–1974. doi: 10.2337/dc15-1419
16. Stages of type 1 diabetes. *Breakthr T1D* <https://breakthrough1d.org.au/what-is-t1d/stages/> [Accessed July 7, 2025]
17. Type 1 diabetes staging classification opens door for intervention | Type 1 Diabetes TrialNet. <https://www.trialnet.org/events-news/blog/type-1-diabetes-staging-classification-opens-door-intervention> [Accessed July 7, 2025]

18. Haller MJ, Bell KJ, Besser REJ, Casteels K, Couper JJ, Craig ME, Elding Larsson H, Jacobsen L, Lange K, Oron T, et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2024: Screening, Staging, and Strategies to Preserve Beta-Cell Function in Children and Adolescents with Type 1 Diabetes. *Horm Res Paediatr* (2024) 97:529–545. doi: 10.1159/000543035
19. Santin I, Eizirik DL. Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and β -cell apoptosis. *Diabetes Obes Metab* (2013) 15 Suppl 3:71–81. doi: 10.1111/dom.12162
20. Onengut-Gumuscu S, Concannon P, Akolkar B, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nierras CR, Pociot F, Todd JA, Rich SS. Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *J Clin Endocrinol Metab* (2025) 110:1505–1513. doi: 10.1210/clinem/dgaf181
21. Kim S-S, Hudgins AD, Yang J, Zhu Y, Tu Z, Rosenfeld MG, DiLorenzo TP, Suh Y. A comprehensive integrated post-GWAS analysis of Type 1 diabetes reveals enhancer-based immune dysregulation. *PLOS ONE* (2021) 16:e0257265. doi: 10.1371/journal.pone.0257265
22. Bradfield JP, Qu H-Q, Wang K, Zhang H, Sleiman PM, Kim CE, Mentch FD, Qiu H, Glessner JT, Thomas KA, et al. A Genome-Wide Meta-Analysis of Six Type 1 Diabetes Cohorts Identifies Multiple Associated Loci. *PLOS Genet* (2011) 7:e1002293. doi: 10.1371/journal.pgen.1002293
23. Marroqui L, Santos RSD, Fløyel T, Grieco FA, Santin I, Pociot F, Eizirik DL. TYK2, a Candidate Gene for Type 1 Diabetes, Modulates Apoptosis and the Innate Immune Response in Human Pancreatic b-Cells.
24. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *The Lancet* (2018) 391:2449–2462. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5
25. De George DJ, Ge T, Krishnamurthy B, Kay TWH, Thomas HE. Inflammation versus regulation: how interferon-gamma contributes to type 1 diabetes pathogenesis. *Front Cell Dev Biol* (2023) 11: doi: 10.3389/fcell.2023.1205590
26. Overview of the Immune System | NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. (2013) <https://www.niaid.nih.gov/research/immune-system-overview> [Accessed July 10, 2025]
27. AXÓN. Primer to the Immune Response. Academic Cell Update Edition. <https://axon.es/ficha/libros/9780123847430/primer-to-the-immune-response-academic-cell-update-edition> [Accessed July 8, 2025]
28. Inmunología de Janeway - Editorial CEPE. <https://editorialcepe.es/> <https://editorialcepe.es/titulo/inmunologia-de-janeway/> [Accessed July 8, 2025]
29. Cellular and Molecular Immunology. (2021). <https://shop.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-75748-5> [Accessed July 10, 2025]
30. Filella X, Molina R, Ballesta AM. Estructura y función de las citocinas. *Med Integral* (2002) 39:63–71.
31. Receptores y señalización: citocinas y quimiocinas. *McGraw Hill Med* <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?sectionid=143394143&bookid=1953> [Accessed July 10, 2025]
32. Roep BO, Thomaidou S, van Tienhoven R, Zaldumbide A. Type 1 diabetes mellitus as a disease of the β -cell (do not blame the immune system?). *Nat Rev Endocrinol* (2021) 17:150–161. doi: 10.1038/s41574-020-00443-4
33. Herold KC, DeLong T, Perdigo AL, Biru N, Brusko TM, Walker LSK. The immunology of type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol* (2024) 24:435–451. doi: 10.1038/s41577-023-00985-4
34. Vera F, Jofré P, Rodríguez D, Lagos R, Quiroga T, Grassi B, Pollak F. Marcadores inmunológicos de diabetes tipo 1: análisis de 4.164 perfiles en un centro de salud de Chile. *Rev Médica Chile* (2021) 149:330–338. doi: 10.4067/s0034-98872021000300330
35. Rodríguez Escobedo R, Mozo Avellaneda L, Delgado Álvarez E, Menéndez Torre E. Autoinmunidad pancreática en el diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 1: utilidad del

- anticuerpo anti transportador 8 del zinc y propuesta de valoración escalonada. *Endocrinol Diabetes Nutr* (2023) 70:286–288. doi: 10.1016/j.endinu.2023.02.001
36. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* (2011) 91:79–118. doi: 10.1152/physrev.00003.2010
 37. Coomans de Brachène A, Alvelos MI, Szymczak F, Zimath PL, Castela A, Marmontel de Souza B, Roca Rivada A, Marín-Cañas S, Yi X, Op de Beeck A, et al. Interferons are key cytokines acting on pancreatic islets in type 1 diabetes. *Diabetologia* (2024) 67:908–927. doi: 10.1007/s00125-024-06106-7
 38. Aislar las células de las muestras para analizar la expresión génica de las PBMCs -. *Nuevo Portal Web OrtoAlresa* (2023) <https://ortoalresa.com/aislar-las-celulas-de-las-muestras-para-analizar-la-expresion-genica-de-las-pbmcs/> [Accessed July 10, 2025]
 39. What are PBMCs? Everything you need to know about Peripheral Blood Mononuclear Cells. (2022) <https://www.reprocell.com/blog/cls/what-is-pbmc> [Accessed July 10, 2025]
 40. Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R. “Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture.” In: Weissert R, editor. *Multiple Sclerosis*. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York (2014). p. 53–61 doi: 10.1007/7651_2014_99
 41. Marín Sánchez O, Vivas-Ruiz D, Neira M, Sandoval GA, Marín- Machuca O, Rodríguez-Landauro AJ, Chacón RD. Rol de los interferones tipo I y tipo III: Una revisión de conceptos. *Rev Científica Ágora* (2019) 6:e6. doi: 10.21679/arc.v6i2.133
 42. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* (2005) 5:375–386. doi: 10.1038/nri1604
 43. Massa C, Wang Y, Marr N, Seliger B. Interferons and Resistance Mechanisms in Tumors and Pathogen-Driven Diseases—Focus on the Major Histocompatibility Complex (MHC) Antigen Processing Pathway. *Int J Mol Sci* (2023) 24:6736. doi: 10.3390/ijms24076736
 44. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* (2010) 207:2053–2063. doi: 10.1084/jem.20101664
 45. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* (2014) 14:36–49. doi: 10.1038/nri3581
 46. Lombardi A, Tsomos E, Hammerstad SS, Tomer Y. Interferon alpha: The key trigger of type 1 diabetes. *J Autoimmun* (2018) 94:7–15. doi: 10.1016/j.jaut.2018.08.003
 47. Gysemans C, Callewaert H, Overbergh L, Mathieu C. Cytokine signalling in the beta-cell: a dual role for IFN γ . *Biochem Soc Trans* (2008) 36:328–333. doi: 10.1042/BST0360328
 48. Tratamiento para la diabetes: Uso de insulina para controlar el azúcar en la sangre. *Mayo Clin* <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/diabetes/in-depth/diabetes-treatment/art-20044084> [Accessed July 7, 2025]
 49. Mauvais F, Van Endert PM. Type 1 Diabetes: A Guide to Autoimmune Mechanisms for Clinicians. *Diabetes Obes Metab* (2025) dom.16460. doi: 10.1111/dom.16460
 50. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Marks JB, McGee PF, Moran AM, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med* (2009) 361:2143–2152. doi: 10.1056/NEJMoa0904452
 51. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Bundy B, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Marks JB, Moran A, Raskin P, et al. B-lymphocyte depletion with rituximab and β -cell function: two-year results. *Diabetes Care* (2014) 37:453–459. doi: 10.2337/dc13-0626
 52. Rigby MR, Harris KM, Pinckney A, DiMeglio LA, Rendell MS, Felner EI, Dostou JM, Gitelman SE, Griffin KJ, Tsalikian E, et al. Alefacept provides sustained clinical and immunological effects in new-onset type 1 diabetes patients. *J Clin Invest* (2015) 125:3285–3296. doi: 10.1172/JCI81722
 53. Orban T, Bundy B, Becker DJ, Dimeglio LA, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Marks JB, Monzavi R, et al. Costimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: follow-up 1 year after cessation of treatment. *Diabetes Care* (2014) 37:1069–1075. doi: 10.2337/dc13-0604

54. Russell WE, Bundy BN, Anderson MS, Cooney LA, Gitelman SE, Goland RS, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Haller MJ, Krischer JP, et al. Abatacept for Delay of Type 1 Diabetes Progression in Stage 1 Relatives at Risk: A Randomized, Double-Masked, Controlled Trial. *Diabetes Care* (2023) 46:1005–1013. doi: 10.2337/dc22-2200
55. von Herrath M, Bain SC, Bode B, Clausen JO, Coppieters K, Gaysina L, Gumprecht J, Hansen TK, Mathieu C, Morales C, et al. Anti-interleukin-21 antibody and liraglutide for the preservation of β -cell function in adults with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* (2021) 9:212–224. doi: 10.1016/S2213-8587(21)00019-X
56. Tatovic D, Marwaha A, Taylor P, Hanna SJ, Carter K, Cheung WY, Luzio S, Dunseath G, Hutchings HA, Holland G, et al. Ustekinumab for type 1 diabetes in adolescents: a multicenter, double-blind, randomized phase 2 trial. *Nat Med* (2024) 30:2657–2666. doi: 10.1038/s41591-024-03115-2
57. Herold KC, Bundy BN, Long SA, Bluestone JA, DiMeglio LA, Dufort MJ, Gitelman SE, Gottlieb PA, Krischer JP, Linsley PS, et al. An Anti-CD3 Antibody, Teplizumab, in Relatives at Risk for Type 1 Diabetes. *N Engl J Med* (2019) 381:603–613. doi: 10.1056/NEJMoa1902226
58. Ramos EL, Dayan CM, Chatenoud L, Sumnik Z, Simmons KM, Szypowska A, Gitelman SE, Knecht LA, Niemoeller E, Tian W, et al. Teplizumab and β -Cell Function in Newly Diagnosed Type 1 Diabetes. *N Engl J Med* (2023) 389:2151–2161. doi: 10.1056/NEJMoa2308743
59. Haller MJ, Long SA, Blanchfield JL, Schatz DA, Skyler JS, Krischer JP, Bundy BN, Geyer SM, Warnock MV, Miller JL, et al. Low-Dose Anti-Thymocyte Globulin Preserves C-Peptide, Reduces HbA1c, and Increases Regulatory to Conventional T-Cell Ratios in New-Onset Type 1 Diabetes: Two-Year Clinical Trial Data. *Diabetes*. (2019) 68:1267–1276. doi: 10.2337/db19-0057
60. Mastrandrea L, Yu J, Behrens T, Buchlis J, Albin C, Fournier S, Quattrin T. Etanercept treatment in children with new-onset type 1 diabetes: pilot randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Diabetes Care* (2009) 32:1244–1249. doi: 10.2337/dc09-0054
61. Quattrin T, Haller MJ, Steck AK, Felner EI, Li Y, Xia Y, Leu JH, Zoka R, Hedrick JA, Rigby MR, et al. Golimumab and Beta-Cell Function in Youth with New-Onset Type 1 Diabetes. *N Engl J Med* (2020) 383:2007–2017. doi: 10.1056/NEJMoa2006136
62. Rigby MR, Hayes B, Li Y, Vercruysse F, Hedrick JA, Quattrin T. Two-Year Follow-up From the T1GER Study: Continued Off-Therapy Metabolic Improvements in Children and Young Adults With New-Onset T1D Treated With Golimumab and Characterization of Responders. *Diabetes Care* (2023) 46:561–569. doi: 10.2337/dc22-0908
63. Lin CM, Cooles FA, Isaacs JD. Basic Mechanisms of JAK Inhibition. *Mediterr J Rheumatol* (2020) 31:100–104. doi: 10.31138/mjr.31.1.100
64. Minaudo C. Vía JAK-STAT e inhibidores JAK. *Dermatol Argent* (2022) 28:55–62. doi: 10.47196/da.v28i2.2324
65. Rusiñol L, Puig L. Tyk2 Targeting in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Int J Mol Sci* (2023) 24:3391. doi: 10.3390/ijms24043391
66. Burke JR, Cheng L, Gillooly KM, Strnad J, Zupa-Fernandez A, Catlett IM, Zhang Y, Heimrich EM, McIntyre KW, Cunningham MD, et al. Autoimmune pathways in mice and humans are blocked by pharmacological stabilization of the TYK2 pseudokinase domain. *Sci Transl Med* (2019) 11:eaaw1736. doi: 10.1126/scitranslmed.aaw1736
67. Waibel M, Wentworth JM, So M, Couper JJ, Cameron FJ, MacIsaac RJ, Atlas G, Gorelik A, Litwak S, Sanz-Villanueva L, et al. Baricitinib and β -Cell Function in Patients with New-Onset Type 1 Diabetes. *N Engl J Med* (2023) 389:2140–2150. doi: 10.1056/NEJMoa2306691
68. Ge T, Jhala G, Fynch S, Akazawa S, Litwak S, Pappas EG, Catterall T, Vakil I, Long AJ, Olson LM, et al. The JAK1 Selective Inhibitor ABT 317 Blocks Signaling Through Interferon- γ and Common γ Chain Cytokine Receptors to Reverse Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Front Immunol* (2020) 11:588543. doi: 10.3389/fimmu.2020.588543

69. Trivedi PM, Graham KL, Scott NA, Jenkins MR, Majaw S, Sutherland RM, Fynch S, Lew AM, Burns CJ, Krishnamurthy B, et al. Repurposed JAK1/JAK2 Inhibitor Reverses Established Autoimmune Insulinitis in NOD Mice. *Diabetes* (2017) 66:1650–1660. doi: 10.2337/db16-1250
70. Philips RL, Wang Y, Cheon H, Kanno Y, Gadina M, Sartorelli V, Horvath CM, Darnell JE, Stark GR, O'Shea JJ. The JAK-STAT pathway at 30: Much learned, much more to do. *Cell* (2022) 185:3857–3876. doi: 10.1016/j.cell.2022.09.023
71. Deeks ED, Duggan S. Abrocitinib: First Approval. *Drugs* (2021) 81:2149–2157. doi: 10.1007/s40265-021-01638-3
72. New onset study now open for enrollment — TrialNet launches study to test JAK inhibitors in type 1 diabetes | Type 1 Diabetes TrialNet. <https://www.trialnet.org/events-news/blog/trialnet-launches-study-testing-jak-inhibitors> [Accessed June 24, 2025]
73. Tao J-H, Zou Y-F, Feng X-L, Li J, Wang F, Pan F-M, Ye D-Q. Meta-analysis of TYK2 gene polymorphisms association with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases. *Mol Biol Rep* (2011) 38:4663–4672. doi: 10.1007/s11033-010-0601-5
74. Wallace C, Smyth DJ, Maisuria-Armer M, Walker NM, Todd JA, Clayton DG. The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Genet* (2010) 42:68–71. doi: 10.1038/ng.493
75. Dos Santos RS, Guzman-Llorens D, Perez-Serna AA, Nadal A, Marroqui L. Deucravacitinib, a tyrosine kinase 2 pseudokinase inhibitor, protects human EndoC- β H1 β -cells against proinflammatory insults. *Front Immunol* (2023) 14:1263926. doi: 10.3389/fimmu.2023.1263926
76. Gloyn AL, Ibberson M, Marchetti P, Powers AC, Rorsman P, Sander M, Solimena M. Every islet matters: improving the impact of human islet research. *Nat Metab* (2022) 4:970–977. doi: 10.1038/s42255-022-00607-8
77. Li G, Craig-Schapiro R, Redmond D, Chen K, Lin Y, Geng F, Gao M, Rabbany SY, Suresh G, Pearson B, et al. Vascularization of human islets by adaptable endothelium for durable and functional subcutaneous engraftment. *Sci Adv* (2025) 11:eadq5302. doi: 10.1126/sciadv.adq5302
78. Palmer C, Diehn M, Alizadeh AA, Brown PO. Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC Genomics* (2006) 7:115. doi: 10.1186/1471-2164-7-115
79. [elsevier.es/es-revista-endocrinologia-diabetes-nutricion-13-congresos-xxxiii-congreso-sociedad-espanola-diabetes-144-sesion-epidemiologia-6973-comunicacion-prevalencia-de-autoanticuerpos-en-diabetes-84312](https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-diabetes-nutricion-13-congresos-xxxiii-congreso-sociedad-espanola-diabetes-144-sesion-epidemiologia-6973-comunicacion-prevalencia-de-autoanticuerpos-en-diabetes-84312). <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-diabetes-nutricion-13-congresos-xxxiii-congreso-sociedad-espanola-diabetes-144-sesion-epidemiologia-6973-comunicacion-prevalencia-de-autoanticuerpos-en-diabetes-84312> [Accessed July 4, 2025]
80. Saisho Y. Postprandial C-Peptide to Glucose Ratio as a Marker of β Cell Function: Implication for the Management of Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci* (2016) 17:744. doi: 10.3390/ijms17050744
81. Taylor PC, Keystone EC, Van Der Heijde D, Weinblatt ME, Del Carmen Morales L, Reyes Gonzaga J, Yakushin S, Ishii T, Emoto K, Beattie S, et al. Baricitinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* (2017) 376:652–662. doi: 10.1056/NEJMoa1608345
82. Schattgen SA, Oguin TH, Thomas PG. The antiviral molecule Mx1 positively regulates the induction of type I IFN in response to influenza infection. *J Immunol* (2016) 196:202.7. doi: 10.4049/jimmunol.196.Supp.202.7
83. Kallionpää H, Somani J, Tuomela S, Ullah U, de Albuquerque R, Lönnberg T, Komsa E, Siljander H, Honkanen J, Härkönen T, et al. Early Detection of Peripheral Blood Cell Signature in Children Developing β -Cell Autoimmunity at a Young Age. *Diabetes* (2019) 68:2024–2034. doi: 10.2337/db19-0287

84. Kallionpää H, Elo LL, Laajala E, Mykkänen J, Ricaño-Ponce I, Vaarma M, Laajala TD, Hyöty H, Ilonen J, Veijola R, et al. Innate immune activity is detected prior to seroconversion in children with HLA-conferred type 1 diabetes susceptibility. *Diabetes* (2014) 63:2402–2414. doi: 10.2337/db13-1775
85. Roep BO, Kleijwegt FS, van Halteren AGS, Bonato V, Boggi U, Vendrame F, Marchetti P, Dotta F. Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* (2010) 159:338–343. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.04087.x
86. Schulthess FT, Paroni F, Sauter NS, Shu L, Ribaux P, Haataja L, Strieter RM, Oberholzer J, King CC, Maedler K. CXCL10 Impairs β Cell Function and Viability in Diabetes through TLR4 Signaling. *Cell Metab* (2009) 9:125–139. doi: 10.1016/j.cmet.2009.01.003
87. Shimada A, Oikawa Y, Yamada Y, Okubo Y, Narumi S. The role of the CXCL10/CXCR3 system in type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud RDS* (2009) 6:81–84. doi: 10.1900/RDS.2009.6.81
88. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Ferrannini E, Fallahi P. CXCR3, CXCL10 and type 1 diabetes. *Cytokine Growth Factor Rev* (2014) 25:57–65. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.01.006
89. Zhang R, Li Y, Pan B, Li Y, Liu A, Li X. Increased expression of hub gene CXCL10 in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Exp Ther Med* (2019) 18:4067–4075. doi: 10.3892/etm.2019.8013
90. Richardson SJ, Rodriguez-Calvo T, Gerling IC, Mathews CE, Kaddis JS, Russell MA, Zeissler M, Leete P, Krogvold L, Dahl-Jørgensen K, et al. Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes. *Diabetologia* (2016) 59:2448–2458. doi: 10.1007/s00125-016-4067-4
91. Skog O, Korsgren S, Wiberg A, Danielsson A, Edwin B, Buanes T, Krogvold L, Korsgren O, Dahl-Jørgensen K. Expression of Human Leukocyte Antigen Class I in Endocrine and Exocrine Pancreatic Tissue at Onset of Type 1 Diabetes. *Am J Pathol* (2015) 185:129–138. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.09.004
92. Jamali Z, Nazari M, Khoramdelazad H, Hakimizadeh E, Mahmoodi M, Karimabad MN, Hassanshahi G, Rezaeian M, Balaei P, Darakhshan S, et al. Expression of CC chemokines CCL2, CCL5, and CCL11 is associated with duration of disease and complications in type-1 diabetes: a study on Iranian diabetic patients. *Clin Lab* (2013) 59:993–1001. doi: 10.7754/clin.lab.2012.120810
93. Mir MM, Alfaifi J, Sohail SK, Rizvi SF, Akhtar MT, Alghamdi MAA, Mir R, Wani JI, Sabah ZU, Alhumaydhi FA, et al. The Role of Pro-Inflammatory Chemokines CCL-1, 2, 4, and 5 in the Etiopathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus in Subjects from the Asir Region of Saudi Arabia: Correlation with Different Degrees of Obesity. *J Pers Med* (2024) 14:743. doi: 10.3390/jpm14070743
94. Ooms M, Strom A, Strassburger K, Menart B, Leslie RD, Schloot NC. Increased spontaneous CCL2 (MCP-1) and CCL5 (RANTES) secretion in vitro in LADA compared to type 1 diabetes and type 2 diabetes: Action LADA 14. *Diabetes Metab Res Rev* (2021) 37:e3431. doi: 10.1002/dmrr.3431
95. Pan X, Kaminga AC, Kinra S, Wen SW, Liu H, Tan X, Liu A. Chemokines in Type 1 Diabetes Mellitus. *Front Immunol* (2021) 12:690082. doi: 10.3389/fimmu.2021.690082
96. Sarkar SA, Lee CE, Victorino F, Nguyen TT, Walters JA, Burrack A, Eberlein J, Hildemann SK, Homann D. Expression and Regulation of Chemokines in Murine and Human Type 1 Diabetes. *Diabetes* (2012) 61:436–446. doi: 10.2337/db11-0853
97. GRO- α regulation in airway smooth muscle by IL-1 β and TNF- α : role of NF- κ B and MAP kinases. doi: 10.1152/ajplung.00384.2005
98. Anisowicz A, Messineo M, Lee SW, Sager R. An NF-kappa B-like transcription factor mediates IL-1/TNF-alpha induction of gro in human fibroblasts. *J Immunol Baltim Md 1950* (1991) 147:520–527.