



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE PEDIATRIA  
CENTRO MEDICO NACIONAL "SIGLO XXI"**

**"EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LINFOCITOS NKT EN  
PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1, SUS FAMILIARES  
DE PRIMER GRADO Y CONTROLES"**

**TESIS DE POSGRADO**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN:**

**PEDIATRIA MEDICA**

**PRESENTA:**

**DR. SALVADOR VERGARA SANCHEZ**

**ASESOR:  
DRA. RITA A. GOMEZ DIAZ**



**MÉXICO, D. F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

Dr. Miguel Angel Villasis Keever  
Jefe de la Dirección de Educación e Investigación en Salud  
UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI

---

Dr. Héctor González Cabello  
Prof. Titular del 4º año de la Residencia de Pediatría Médica  
Médico Adscrito al Hospital de Pediatría CMN SXXI

---

Dra. Rita A. Gómez Díaz  
Médico Adscrito al Servicio de Endocrinología Pediátrica  
UMAE Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI

#### COLABORADORES

Dr. Vianney Ortiz Navarrete<sup>1</sup>  
M en BE Elsy Canché<sup>2</sup>  
Dra. Rocío Herrera Márquez<sup>3</sup>  
Dra. Elisa Nishimura Meguro<sup>4</sup>

1. Investigador Titular del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV.
2. Estudiante del Doctorado en Ciencias. Departamento de Biomedicina del CINVESTAV.
3. Médico Adscrito al Servicio de Endocrinología Pediátrica, UMAE Hospital de Pediatría, CMN SXXI
4. Jefe del Servicio de Endocrinología Pediátrica, UMAE Hospital de Pediatría, CMN SXXI

*A mi esposa e hija;  
que representan la fuente de inspiración para alcanzar mis logros.*

## **INDICE**

Introducción	1
Justificación	7
Planteamiento del problema	8
Hipótesis	9
Objetivos	9
Material y métodos	10
Resultados	15
Discusión	19
Conclusión	23
Bibliografía	24

Palabras clave: Diabetes tipo 1, pacientes con diabetes tipo 1, familiares de primer grado, NKT, linfocitos NKT, linfocitos.

# **EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE LINFOCITOS NKT EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 1, SUS FAMILIARES DE PRIMER GRADO Y CONTROLES**

**INTRODUCCION.** La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por la presencia de hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. Su comportamiento epidemiológico a nivel mundial y en nuestro país muestra una tendencia al incremento en los últimos años. La diabetes tipo 1, es una autoinmunidad órgano-específica en la que participan factores ambientales, inmunológicos y genéticos. La inflamación que ocurre en los islotes pancreáticos aparece previo al daño tisular y a la destrucción de las células  $\beta$ . En el modelo del ratón no obeso (NOD), se ha establecido que los linfocitos T CD4, CD8 y la dicotomía funcional de linfocitos T reguladores (Th1/Th2) participan en el desarrollo de la enfermedad. Es concebible que la respuesta autoinmune se deba a una falla de los mecanismos reguladores de la inmunidad adquirida; y dentro de estos candidatos están las células NKT, una subpoblación de linfocitos T identificadas en el ratón NOD y en el humano, asociadas con el desarrollo de algunas enfermedades autoinmunes y que poseen función reguladora mediada por la secreción de citocinas anti-inflamatorias. Estudios en el ratón NOD muestran que existe un defecto del número y función de las células NKT, por lo que la enfermedad puede disminuir mediante la transferencia de poblaciones de células NKT, o acelerarse al transferir células NKT de ratones prediabéticos a ratones NOD inmunocompetentes. A la fecha existen estudios en humanos con diabetes tipo 1 cuyos resultados son controversiales; algunos han documentado defectos cuantitativos (alteraciones en el número) y defectos funcionales (relacionados con la capacidad de secretar citocinas), mientras que otro describe ausencia de defectos en este subgrupo de células T. Tales resultados difieren entre ellos posiblemente por el tipo de población seleccionada para el estudio, así como el estadio o tiempo de evolución de la enfermedad en los pacientes.

**OBJETIVO.** En nuestro estudio deseamos comparar la concentración de células NKT en pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado contra la de sujetos controles.

**METODOS.** Se realizó un estudio transversal analítico en el Servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría de la U.M.A.E. Centro Médico Nacional "Siglo XXI". Se reclutaron pacientes con diabetes tipo 1, sus familiares de primer grado y sujetos controles del periodo comprendido de julio del 2004 a julio 2006, a los que se hizo toma de muestra sanguínea para la determinación de células NKT mediante citometría de flujo utilizando como marcadores de fenotipo celular la triple positividad para CD3+ V 24+ V 11+. Se utilizó un análisis descriptivo para los datos relacionados al sexo, edad, peso, talla, IMC, tiempo de evolución de la enfermedad, dosis de insulina, niveles de Hb1Ac y concentración de NKT utilizando medidas de tendencia central (mediana, mínimo y máximo); y para comparar los porcentajes y números absolutos de linfocitos NKT entre los grupos estudiados se empleo la prueba de Kruskal-Wallis, mediante el programa estadístico Sigma Stat. Se consideró significancia estadística un valor de  $p < 0.05$ .

## **INTRODUCCION**

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por la presencia de hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. La hiperglucemia crónica se encuentra asociada a largo plazo con daño, disfunción y falla de varios órganos (ojos, riñones, corazón, nervios y vasos sanguíneos) <sup>1</sup>. El comportamiento epidemiológico de la DM a nivel mundial ha mostrado una tendencia al incremento en los últimos años; la prevalencia de esta enfermedad en el año 2000 fue de 2.8% (alrededor de 171 millones) y se estima que para el 2030 será de 4.4% aproximadamente (cerca de 366 millones) <sup>2</sup>. De acuerdo con los datos reportados por la Organización Panamericana de Salud, con base en el DIAMOND Project Group, en el continente americano el número de pacientes con DM en el año 2000 era de 35 millones, de los cuales 19 millones (54%) vivían en América Latina y el Caribe; y según la proyecciones de esta Organización, para el año 2025 esta cifra ascenderá a 64 millones, de los cuales 40 millones (64%) corresponderá a América Latina y el Caribe <sup>3-5</sup>. En relación a la diabetes tipo 1 en nuestro país esta tendencia es similar; según el registro del Grupo Ciudad de México, que informa los datos en conjunto de diversas instituciones en el Valle de México, la incidencia fue de 0.43 en 1984 y 0.47 por 100 000 habitantes en 1988 <sup>6</sup>, estudios epidemiológicos realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la incidencia de diabetes tipo 1 en nuestro país demuestran que en 1993 la incidencia fue de 0.6 por 100 000 habitantes <sup>5</sup>; mientras que y según la OPS la incidencia reportada en el año 2000 es de 1.5 por 100,000 habitantes. <sup>3</sup> En la consulta externa del servicio de endocrinología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" es el principal problema de atención médica de tipo endocrinológico. Por ello es necesario implementar estrategias de detección temprana de la enfermedad en familiares de primer grado con la finalidad de evitar las complicaciones agudas como la cetoacidosis diabética, que puede poner en peligro la vida; así mismo, para iniciar lo antes posible el manejo del control metabólico estricto y evitar progresión de las complicaciones tardías a causa de la hiperglucemia.

La diabetes tipo 1, actualmente es considerada como una autoinmunidad órgano-específica, en la cual participan como factores etiológicos los de tipo inmunológico, genético, así como los ambientales <sup>7</sup>.

Dentro de las evidencias que apoyan los factores genéticos encontramos que el hecho de que para gemelos monocigóticos la concordancia de aparición de diabetes tipo 1 sea de menos del 50% indica una predisposición genética multifactorial (participación de factores genéticos y ambientales); un amplio número de genes se han implicado en la patogénesis de la enfermedad, pero la mayoría de ellos tiene baja asociación o bien la asociación no ha podido ser confirmada <sup>8,9</sup>. Una excepción son los genes de HLA, los cuales han demostrado que contribuyen hasta en un 50% como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 1. Así en población caucásica la susceptibilidad la presentan los individuos que expresan un haplotipo HLA DRB1\*0302-DQA1\*0301 y se convierte en alta susceptibilidad cuando se combina con la presencia de DRB1\*0202-DQA1\*0501; mientras que un haplotipo DRB1\*0602-DQA1\*0102 tiene un efecto protector de la enfermedad. Otros alelos de HLA también se han identificado como factores de riesgo y protección, pero su frecuencia varía dependiendo de los grupos étnicos estudiados <sup>9</sup>. En población México-americana DRB1\*0302 es un alelo de riesgo mientras que el protector es el DRB1\*1402, en cambio para los mestizos mexicanos el haplotipo de riesgo es DRB1\*0405, DQA1\*0301, DQB1\*0302 <sup>10,11</sup>. Otros genes complejo HLA, en particular los de clase I también se han asociado a la diabetes tipo 1, pero solamente la asociación fuerte se observa con los genes clase II (DQ y DR) ya mencionados. A pesar de que actualmente se conocen detalles estructurales de esas moléculas, como es la identificación de residuos de aminoácidos que favorecen la unión y presentación de péptidos diabetogénicos a los linfocitos T CD4 <sup>12,13</sup>, aún no está claro el mecanismo por el cual esas moléculas favorecen o evitan el establecimiento de la enfermedad, sin embargo son evidencias indirectas que apoyan la participación de una respuesta autoinmune mediada por linfocitos T CD4 en la inmunopatología de la enfermedad.

La participación del componente autoinmune proviene de tres tipos de evidencias <sup>7</sup>:

- a) La presencia de un infiltrado inflamatorio (insulitis) en los islotes de Langerhans, una fuerte asociación entre la presencia de la enfermedad.
- b) Algunos alelos del complejo principal de histocompatibilidad (HLA).
- c) La presencia de autoanticuerpos específicos contra autoantígenos de los islotes pancreáticos.

El resultado de la respuesta autoinmune crónica es la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas productoras de insulina y microscópicamente se observa como un infiltrado inflamatorio constituida principalmente de macrófagos y linfocitos T (insulitis) sin que se vean afectadas las células productoras de glucagón, somatostatina y polipéptidos pancreáticos. Se considera que del 60 al 80% de las células  $\beta$  ya están destruidas al momento de la manifestación clínica de la enfermedad y no es sino hasta alrededor de los siguientes 3 meses cuando termina dicho proceso inflamatorio<sup>14</sup>. Diversos estudios han mostrado que la inflamación aparece desde etapas anteriores a la manifestación del daño tisular y la destrucción de las células  $\beta$  correlaciona directamente con presencia de linfocitos T productores de interferón gama (IFN- $\gamma$ ), en los infiltrados locales de los islotes <sup>15-19</sup>. En el modelo del ratón no obeso (NOD), ha quedado establecido que tanto los linfocitos T CD4 como los linfocitos T CD8 participan en el desarrollo de la enfermedad <sup>20</sup>, además se ha documentado la dicotomía funcional linfocitos T reguladores (Th1/Th2) en el establecimiento de la diabetes tipo 1. La mayoría de los estudios señalan que los linfocitos Th1 contribuyen a la inmunopatología mientras que los Th2 intermedian protección <sup>21-23</sup>; sin embargo aún existe debate al respecto, debido a que otros estudios señalan que los linfocitos Th2 también poseen potencial diabetogénico <sup>24-26</sup>. A este respecto se tiene poca información para la diabetes tipo 1 humana, pero debido a la similitud con el modelo experimental de ratones NOD se considera que estarían participando mecanismos inmunopatológicos semejantes. Una evidencia indirecta al respecto lo representa el hecho que los autoanticuerpos presentes en los pacientes son principalmente de isotipo IgG1, lo sugiere la participación de respuesta de linfocitos Th1 <sup>14,27</sup>.

Recientemente se ha incorporado a este complejo escenario efector, una subpoblación de linfocitos T CD4 que presentan características de células reguladoras y que poseen el fenotipo T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, estas células en el modelo NOD previenen y/o disminuyen el desarrollo de la enfermedad <sup>28</sup>.

La evidencia inicial de autoinmunidad en los pacientes con diabetes tipo 1, fue la presencia de anticuerpos circulantes que reaccionaban con los islotes pancreáticos en un alto porcentaje de individuos con diagnóstico reciente <sup>29</sup>. Ello condujo a una búsqueda intensa para identificar a los autoantígenos, actualmente se conoce que principalmente son tres las proteínas de los islotes que son blanco de la respuesta de anticuerpos: la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), la fosfatasa de tirosina (IA-2) y la insulina. La cuantificación de los anticuerpos contra esos autoantígenos, ha sido útil para conocer la actividad de la enfermedad, para determinar el grado de progresión de la misma y contribuye a clasificar y predecir el estado clínico de los pacientes. Del 60 al 80% de los pacientes recién diagnosticados presentan anticuerpos anti-GAD, un porcentaje semejante (60 al 70%) presentan anti-IA2 y solamente entre un 30 al 50% presentan anti-insulina. Los estudios prospectivos en familiares de pacientes con la enfermedad muestran que la presencia de dos o más tipos de autoanticuerpos proporciona un alto valor predictivo de riesgo para presentar la enfermedad <sup>7,14,30</sup>. A pesar de estos hallazgos, aún no se conocen los mecanismos moleculares que intervienen en la generación de esos autoanticuerpos, pero su aparición temprana sugiere que el daño tisular, que permitiría la accesibilidad de esas proteínas a los linfocitos B, estaría ocurriendo tan tempranamente que no se cuenta con los recursos tecnológicos que nos permitan conocer el inicio de ese proceso. Lo que parece estar claro, es que los autoanticuerpos no participan directamente en la inmunopatología, como lo sugiere el desarrollo de diabetes tipo 1 aún en el caso de padecer agammaglobulinemia ligada al X <sup>31</sup>, una inmunodeficiencia donde el desarrollo de los linfocitos B está completamente detenido en estado de pre-B, y los pacientes presentan niveles muy bajos de todos los isotipos de inmunoglobulinas.

Es concebible que la respuesta autoinmune en la diabetes tipo 1 se deba a una falla de los mecanismos reguladores de la inmunidad adquirida, esos defectos

podiesen ser en la expansión y/o función de las poblaciones de linfocitos T. A la fecha no se han identificado, con precisión, a la población de células reguladoras, pero existen varios candidatos entre los que se incluyen las células NKT. En el ratón y en el humano la presencia de un número reducido de estas células se asocia con el desarrollo de enfermedades autoinmunes. La prevención de autoinmunidad en diversos modelos experimentales mediante la reconstitución con este tipo de células sugiere fuertemente la importancia de su función en los mecanismos de tolerancia inmunológica en contra de los antígenos propios.

Las NKT fueron identificadas en 1987 en el ratón <sup>32,33</sup> y en 1994 se describió su contraparte en humanos <sup>34,35</sup> se trata de una población de linfocitos que expresan el receptor para el antígeno de linfocitos T (TCR) así como el marcador común de las células NK (NK 1.1 para el ratón, CD161 en el humano). Se trata de una población heterogénea que puede ser CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (doble negativas o DN); las cuales expresan el TCR de forma conservada; en humanos el TCR está constituido por cadenas invariantes y regiones variables (V $\alpha$ 24 y V $\beta$ 11). Estas células responden a antígenos presentados en el contexto de moléculas CD1d, por lo que en ratones se ha demostrado su capacidad antitumoral, así como su función reguladora mediada por la secreción de las citocinas anti-inflamatorias: IL-4 e IL-13 <sup>36</sup>.

En términos de autoinmunidad e inflamación, los principales resultados provienen de la prevención de diabetes en el modelo del ratón NOD. Diversos estudios muestran un defecto del número y función de las células NKT en esos ratones, por lo que la enfermedad puede disminuir mediante la transferencia adoptiva de poblaciones enriquecidas de células NKT <sup>37-42</sup>. La importancia de las poblaciones de células reguladoras en este modelo animal, también se expresa por el hecho de que la transferencia de poblaciones de células obtenidas del bazo y timo de ratones pre-diabéticos acelera la aparición de la enfermedad en ratones NOD inmunocompetentes a los que se realizó timectomía <sup>43, 44</sup>. Se ha postulado que la deficiencia en esta subpoblación de células T en el ratón NOD es producto de defectos intrínsecos en las estirpes de células T favoreciendo el desarrollo de diabetes autoinmune, y que pueden ser detectables desde la 3a semana de vida y que guarda relación con el papel que

desempeñan los linfocitos CD8<sup>+</sup> (a los cuales se ha atribuido una capacidad prodiabetogénica al ser responsables de favorecer la insulinitis en este modelo animal)<sup>45, 46, 47</sup>. A la fecha existen estudios en humanos con diabetes tipo 1 que han documentado defectos cuantitativos (alteraciones en el número) y defectos funcionales (relacionados con la capacidad de secretar citocinas) en este subgrupo de células T; mientras que Wilson SB y cols. (1998) y Kukreja A y cols. (2002) señalan que existe una disminución en el número de las células NKT y su capacidad de producción de IL-4<sup>48,49</sup>; Lee PT y cols (2002) señala que en pacientes con diabetes tipo 1 hay ausencia de defectos en el número de estas células comparadas con sujetos controles y en riesgo<sup>50</sup>, y Oikawa Y y cols (2002, 2003) describe un incremento en la frecuencia de estas células<sup>51,52</sup>. La discrepancia en estos reportes parece provenir del tipo de población seleccionada para el estudio así como el estadio o tiempo de evolución de la enfermedad en los pacientes. Sin embargo, recientemente en el modelo del ratón NOD se demostró una adecuada correlación entre la cuenta de células NKT periféricas y lo que ocurre a nivel local en el páncreas del ratón NOD, lo que lo valida como un modelo para estudios de diabetes tipo 1 en humanos<sup>42</sup>.

Con el propósito de conocer más detalles relacionados con la biología de las células NKT Kennedy y cols.<sup>53</sup> trataron de identificar los transcritos más abundantes producidos por células NKT DN activadas, para ello utilizaron técnicas de hibridación sustractiva en genotecas de cDNA. Enfocándose principalmente a las células DN, encontraron que dichas células presentan un patrón de expresión génica similar al de las células T citotóxicas tipo 2 (TC2). Identificaron una expresión abundante de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, granzimas, linfotactina y en menor proporción IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , MIP1 $\alpha$  y RANTES, además de una molécula que al parecer se expresa solo en las células CD8, NKT DN y NKT CD4<sup>+</sup>, a la que denominaron: Class I Restricted T Cell Associated Molecule (CRTAM) por que se trataba de reconocimientos restringidos por moléculas clase I<sup>53</sup>. Dado que se expresa en respuesta a activación in vitro con estímulos mitogénicos, pensamos que su expresión in vivo podría ser un marcador para el seguimiento y análisis de las poblaciones que la expresan.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Considerando que las células NKT es un conjunto de linfocitos que participan en la inmunorregulación de la respuesta inmune contra los islotes pancreáticos y aunado a que estas células podrían participar en las fases iniciales del proceso autoinmune; fué de nuestro interés comparar la frecuencia de las células NKT en pacientes con diabetes tipo 1, así como en sus familiares de primer grado y en sujetos controles. Por lo que surgió la siguiente pregunta de investigación:

¿Es distinta la concentración de las células NKT en pacientes diabéticos tipo 1, sus familiares de primer grado y en sujetos controles?

## **JUSTIFICACIÓN**

En el servicio de endocrinología los casos de primera vez de diabetes tipo 1 se ha incrementado en los últimos años. Faltan marcadores genéticos o inmunológicos que permitan identificar a la población en riesgo y tomar las medidas necesarias para evitar o retardar el daño de la célula beta pancreática.

En la patogénesis de la diabetes tipo 1 se ha implicado el papel de la autoinmunidad. La destrucción de la célula beta se considera secundaria a defectos en los mecanismos que participan en la regulación de la respuesta inmune adquirida. Una falla en la regulación de la respuesta inmune se debe a la disminución de la población de células NKT. En el ratón NOD se ha demostrado un defecto tanto en el número como en la función de la población de células NKT y su reconstitución mediante transgénesis previene el desarrollo de la diabetes. En el humano existe dificultad para su identificación por la falta de un marcador inmunológico. Algunos estudios señalan que existe una frecuencia disminuida de la población de células NKT en pacientes con diabetes tipo 1<sup>48,49</sup>; otros han observado ausencia de defectos en el número de células NKT en humanos con diabetes tipo 1<sup>50</sup>, y algunos otros aumento de la frecuencia de esta población celular en pacientes con diabetes tipo 1 de reciente inicio, e inclusive en el grupo de pacientes con diabetes tipo 1 la cantidad de células NKT es directamente proporcional al tiempo de evolución de la enfermedad<sup>51,52</sup>. Postulamos que la expresión *in vivo* de la molécula CRTAM podría ser un marcador para el seguimiento y análisis de las poblaciones que la expresan. En la primera etapa de nuestro trabajo, se identificó el porcentaje de células NKT tanto en pacientes con diabetes tipo 1 y familiares como en sujetos control, motivo de esta investigación.

## **HIPOTESIS**

### HIPÓTESIS GENERAL

La concentración de las células NKT es distinta en pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado comparado contra la de sujetos controles.

### HIPOTESIS ESPECÍFICAS

1. La concentración de las células NKT en pacientes con diabetes tipo 1 es menor comparada con la de sujetos controles

2. La concentración de las células NKT en familiares de primer grado de pacientes con diabetes tipo 1 es menor comparada con la de sujetos controles

## **OBJETIVOS**

### OBJETIVO GENERAL

Comparar la concentración de células NKT en pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado contra la de sujetos controles.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Comparar la concentración de las células NKT en pacientes con diabetes tipo 1 contra la de sujetos controles.

2. Comparar la concentración de las células NKT en familiares de pacientes con diabetes tipo 1 contra la de sujetos controles.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizó un estudio transversal analítico en el Servicio de Endocrinología del Hospital de Pediatría de la U.M.A.E. Centro Médico Nacional “Siglo XXI” y en colaboración con el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional (IPN); con previa aprobación del Comité Local de Investigación y Ética del Hospital y por la Coordinación Delegacional de Investigación (2004/3603/028).

*Descripción general del estudio.* Se reclutaron pacientes con diabetes tipo 1, sus familiares de primer grado y sujetos controles del periodo comprendido de julio del 2004 a julio 2006.

El diagnóstico de diabetes tipo 1 se realizó de acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes, y con base en manifestaciones clínicas (poliuria, polidipsia y pérdida de peso inexplicable, cetoacidosis) y parámetros bioquímicos (la determinación de glucemia plasmática de ayuno  $> 126$  mg/dl que debe confirmarse repitiendo el examen en un día diferente); ó una glucemia plasmática en cualquier momento del día  $> 200$  mg/dl, (sin considerar el tiempo de la última comida); aunado a que el paciente amerite la aplicación insulina para su manejo.

Para todos los sujetos reclutados se registró nombre, edad, sexo, peso, talla, IMC; y en el caso de los pacientes con diabetes tipo 1 se consideró el tiempo de evolución de la enfermedad a partir del diagnóstico en días, los niveles de hemoglobina glucosilada (Hb1Ac) y la dosis de insulina (unidades/kg/día); y se efectuó la toma de una muestra de sangre de 7 a 10 cc para la determinación de células NKT. Las muestras de sangre total se analizaron en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del CINVESTAV.

*Criterios de inclusión.*

Grupo A: Pacientes con diagnóstico confirmado de diabetes tipo 1 (con una evolución de la enfermedad menor a 3 meses a partir del diagnóstico), ambos sexos, mayores de 2 años y menores de 17 años.

Grupo B: Familiares de primer grado de los pacientes con diabetes tipo 1, ambos sexos, que sean hermanos o padres de pacientes con diabetes tipo 1, y mayores de 2 años de edad.

Grupo C: Sujetos controles: El grupo control estuvo integrado por niños de edad similar a los pacientes, (mayores de 2 años y menores de 17 años), de ambos sexos sin antecedentes de diabetes tipo 1 o alguna otra condición patológica que pudiera interferir en el estudio.

Cada uno de los sujetos incluidos en el estudio fueron derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social y adscrito a la unidad participante del estudio; se solicitó su participación mediante consentimiento informado (de los pacientes y sus padres o tutores).

*Criterios de eliminación:* Se eliminaron a aquellos pacientes y/o familiares en los que no se logró obtener los resultados programados del estudio.

*Análisis estadístico.* Se utilizó un análisis descriptivo para los datos relacionados al sexo, edad, peso, talla, IMC, tiempo de evolución de la enfermedad, dosis de insulina, niveles de Hb1Ac y concentración de NKT utilizando medidas de tendencia central (mediana, mínimo y máximo). Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, mediante el programa estadístico Sigma Stat, para comparar los porcentajes y números absolutos de linfocitos NKT y CD8 entre los grupos estudiados. Se consideró significancia estadística con un valor de  $p < 0.05$ .

Método de medición de células NKT (Figura 1 y 2):

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de los pacientes, familiares de primer grado y controles para la fenotipificación de las células NKT.

*Obtención de células mononucleares:* Las muestras sanguíneas fueron diluidas en una relación 1:1 con solución buffer fosfato salino (PBS), posteriormente se agregaron en tubos de 15 cm<sup>3</sup> que contenían Ficoll Hypaque en una relación 1:2 de muestra sanguínea/Ficoll. Se centrifugó 30 min a 1600 rpm a temperatura ambiente. Las células mononucleares fueron recuperadas de la interfase y la fenotipificación de las poblaciones se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Previo a la tinción con los anticuerpos específicos las células mononucleares se incubaron con gammaglobulina humana durante 20 min a 4 °C y posteriormente se distribuyeron 2x10<sup>6</sup> células en cada tubo para citometría de flujo. Se emplearon anticuerpos comerciales anti-CD3, anti V $\alpha$ 24, anti-V $\beta$ 11<sup>52</sup>.

Cuantificación de linfocitos NKT en sangre periférica:

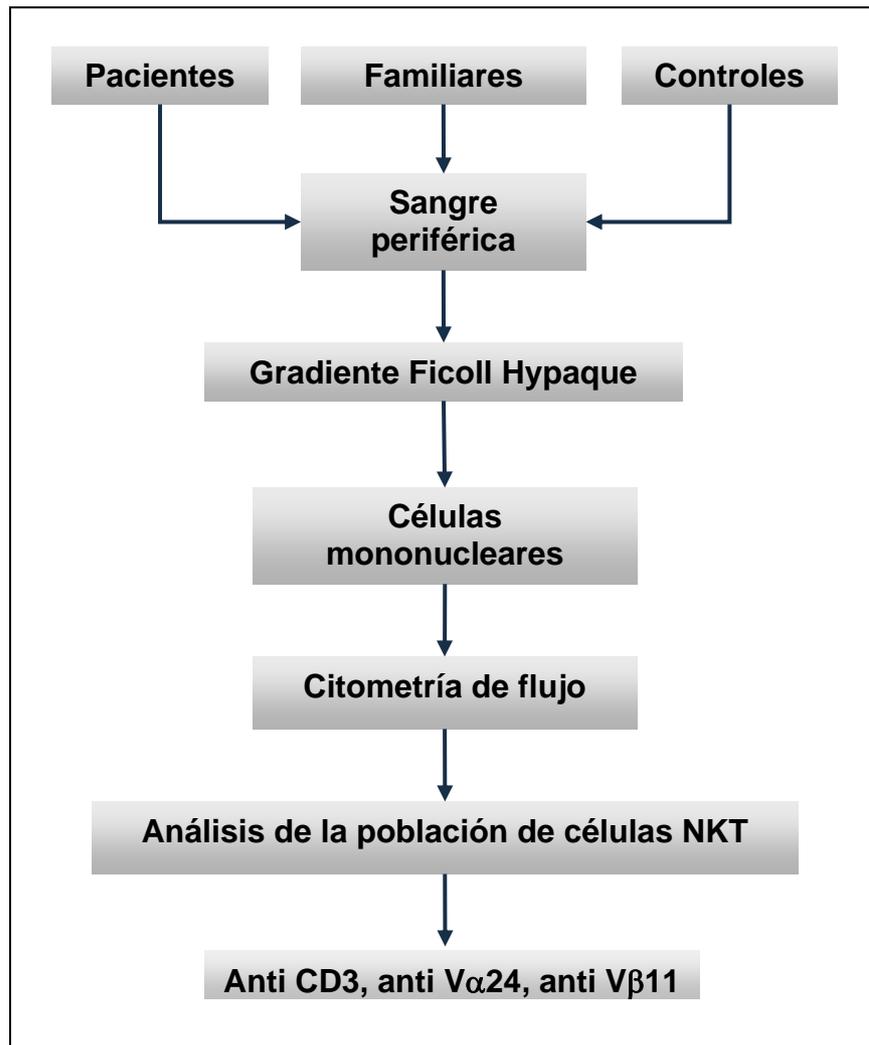
El porcentaje de linfocitos NKT se obtuvo mediante el análisis realizado por citometría de flujo efectuado para cada sujeto. En este análisis se eligió la región correspondiente de linfocitos de acuerdo al tamaño y granularidad de la población como se observa en la Figura 2, a partir de esta región se obtuvo el porcentaje de las células CD3+, V $\alpha$ 24+ , V $\beta$ 11+.

Los números absolutos de la población NKT se calcularon utilizando el número de leucocitos y el porcentaje de linfocitos reportados en la biometría hemática tomada el mismo día que se realizó la citometría de flujo como se describe a continuación:

$$\text{Células NKT/ml: } \frac{\text{Leucocitos} \times \% \text{Linfocitos (en la BH)}}{100} \times \frac{\% \text{ células NKT (en la citometría de flujo)}}{100} \times 1000$$

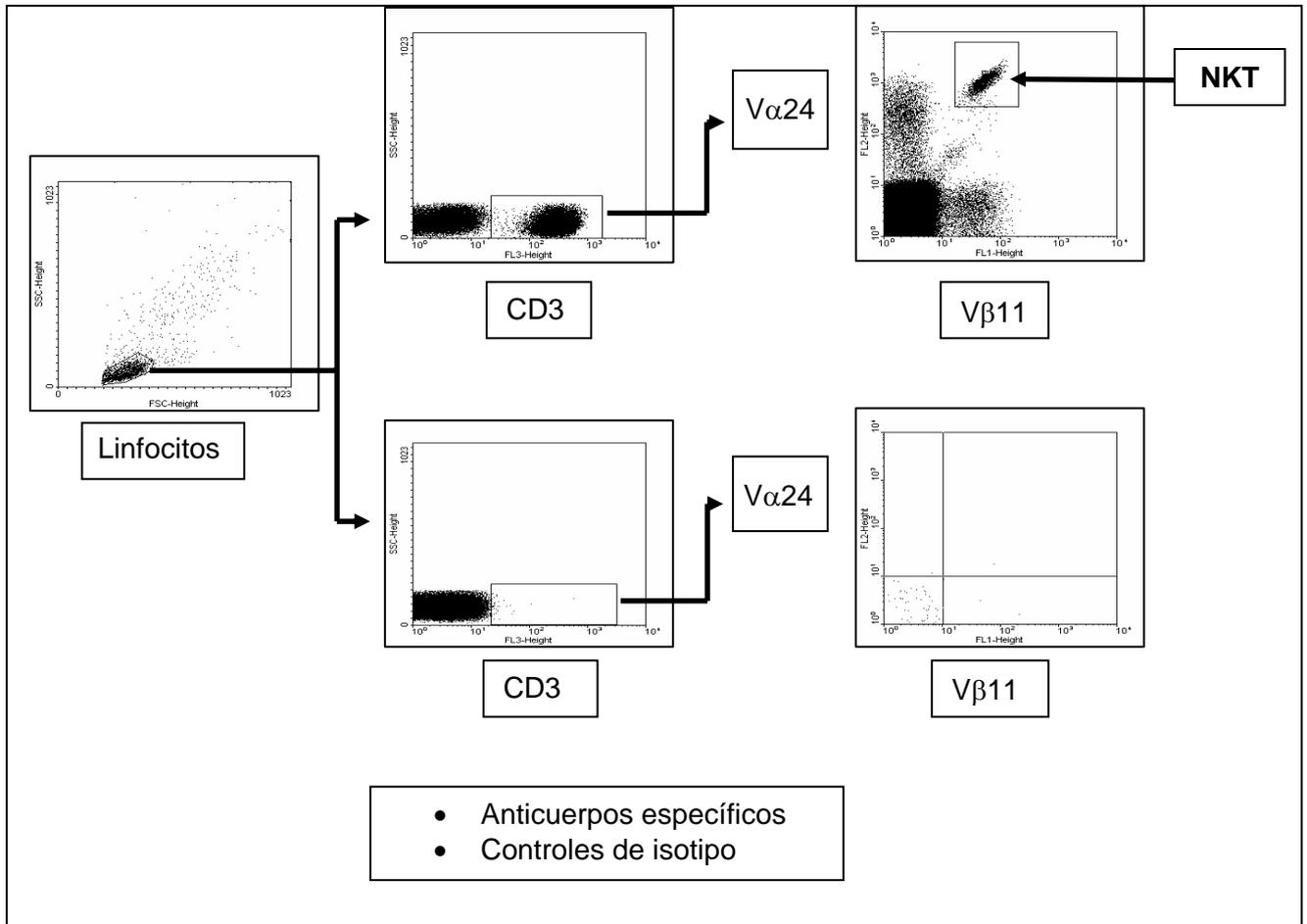
Evaluación de la presencia de linfocitos NKT en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, sus familiares de primer grado y controles.

Figura 1. Algoritmo de procedimiento para la medición de células NKT



Evaluación de la presencia de linfocitos NKT en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, sus familiares de primer grado y controles.

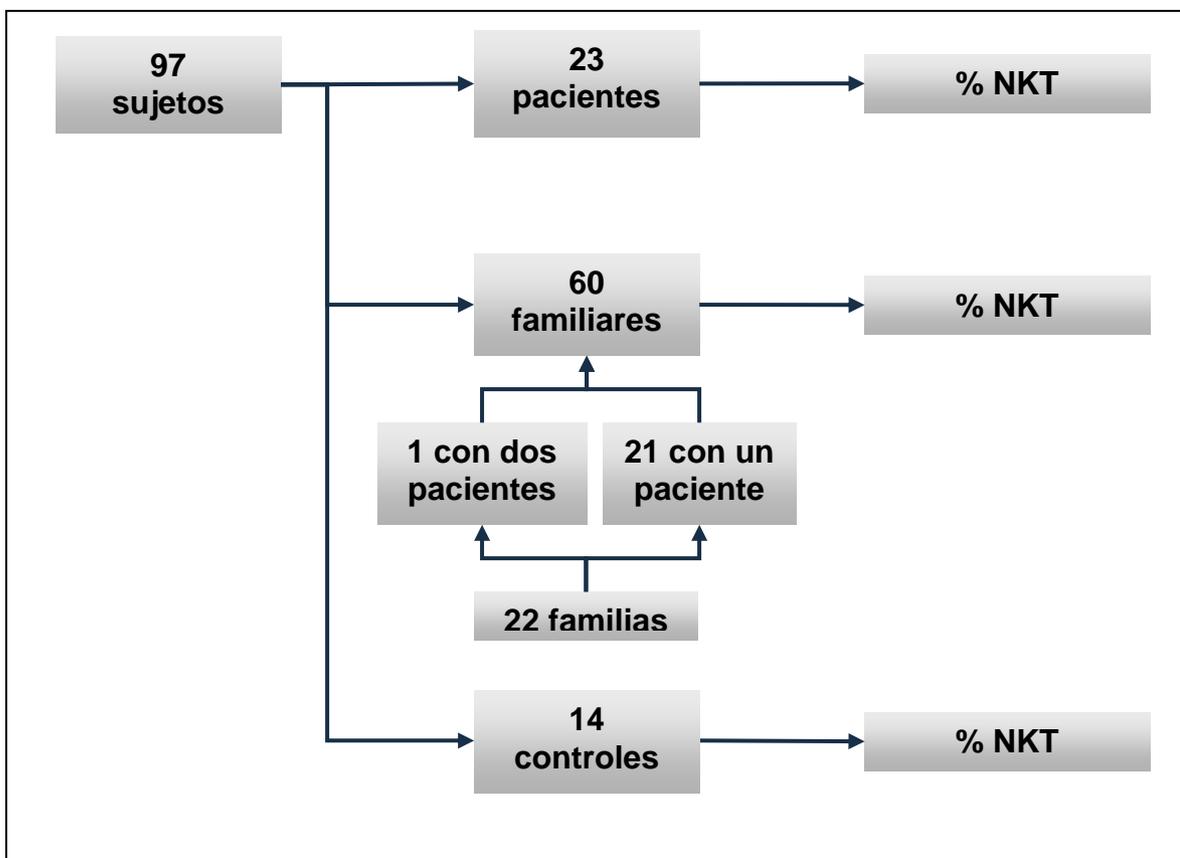
Figura 2. Representación esquemática de la obtención de células NKT por citometría de flujo utilizando los anticuerpos específicos para CD3, V $\alpha$ 24, V $\beta$ 11; así como controles de isotipo.



## **RESULTADOS**

Se incluyeron un total de 97 sujetos, de los cuales 23 de ellos (24%) correspondían al grupo A (pacientes con diabetes tipo 1), 60 (62%) constituyeron el grupo B (familiares de primer grado) y los 14 (14%) restantes formaron el grupo C (controles). (Figura 3).

Figura 3. Distribución de los pacientes en el estudio



*Características del grupo de pacientes con diabetes tipo 1.*

En relación al grupo de pacientes con diabetes tipo 1, 13 (56%) de ellos eran del género masculino y 10 (44%) del género femenino. La media de edad fue de 9.8 años con una desviación estándar (DE) de  $\pm 5$  años. Con respecto a los parámetros antropométricos la media y la DE del peso fue de  $35.94 \pm 18.21$  kg, el valor promedio de la talla fue  $133.97 \pm 25.14$  cm y el IMC medio en  $18.64 \pm 4.16$ . La media del tiempo de evolución del padecimiento fue de  $30.6 \pm 23.3$  días). Dentro de los parámetros bioquímicos que se tomaron al ingreso del hospital los niveles de hemoglobina glucosilada (Hb1Ac) promedio fueron de  $9.43 \pm 2.73$  %.

*Características del grupo de los familiares de primer grado de pacientes con diabetes tipo 1.*

Fueron 60 familiares de primer grado los que se incluyeron en este grupo, de los cuales 28 (46.7%) fueron del sexo masculino y 32 (53.3%) mujeres. En el subgrupo de los padres, el mayor porcentaje correspondió al género femenino con un 56.41% (n = 22), en tanto que el 43.59% fue del masculino. El sexo en el subgrupo de hermanos fue muy similar y el rango de edad se encontró entre 4 a 48 años.

*Características del grupo control.*

En un total de 14 sujetos control, la distribución por género fue similar (7 masculinos y 7 femeninos). La media y DE de la edad fue de  $9.3 \pm 4.2$  años. Con respecto a los parámetros antropométricos la media del peso fue de  $35.6 \pm 17.24$  kg, el valor promedio de la talla fue  $134.78 \pm 23.75$  cm y el IMC de  $18.47 \pm 3.89$ .

Niveles de células NKT en sangre periférica en los grupos estudiados.

Tabla 1. Porcentaje de células NKT en sangre periférica en los grupos estudiados

Grupo	n=	Mediana	Mínimo	Máximo	% n=95
Pacientes con diabetes 1	23	0.0800	0.01	0.45	24.2%
Familiares	58	0.0800	0.00	0.75	61.1%
Controles	14	0.2240	0.04	0.60	14.7%

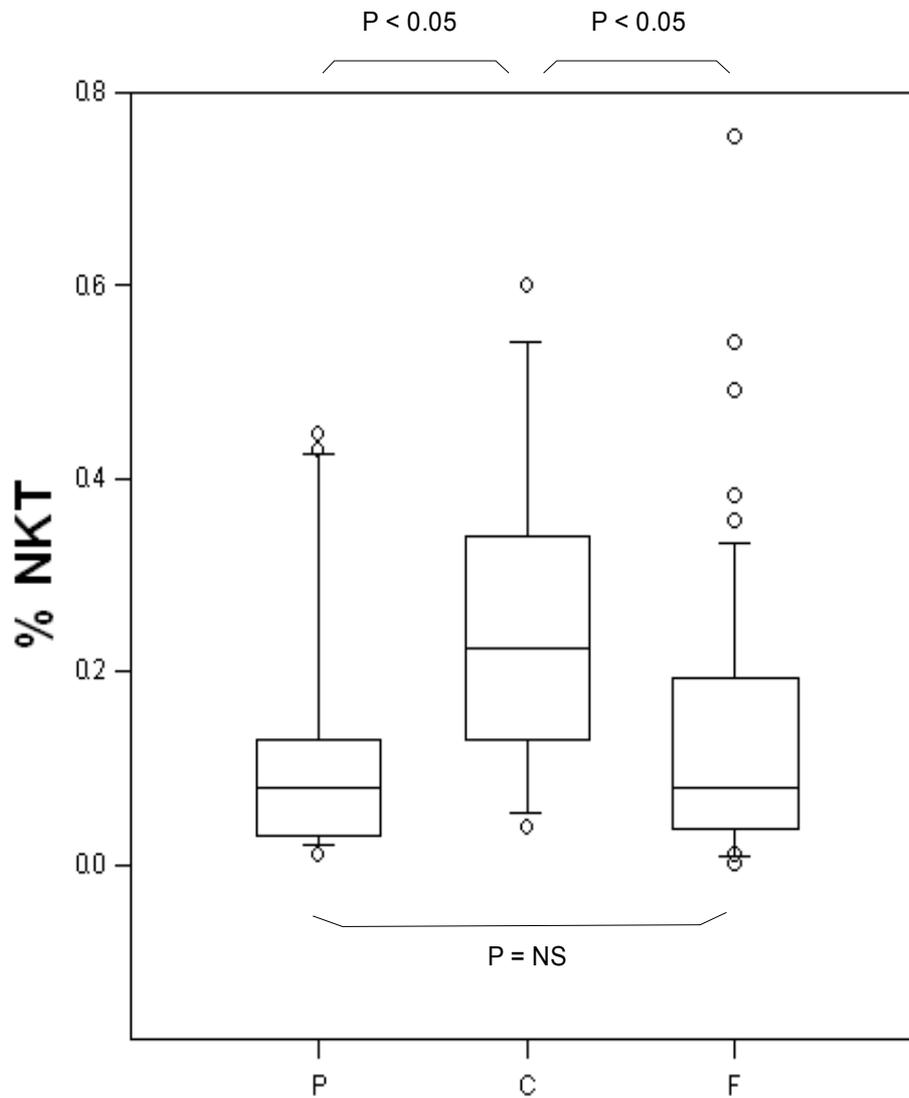
En la tabla 1 se enlistan los resultados obtenidos. La mediana del porcentaje de células NKT en los pacientes con diabetes tipo 1 fue de 0.08% (0.01 a 0.45 ). En dos de los hermanos de los pacientes la cantidad de muestra no fue suficiente para la determinación del porcentaje de células NKT, por lo que se reporta la mediana del porcentaje de células NKT en el grupo de familiares de primer grado (n=58), el cual fue de 0.08 (0.00 a 0.75) y en el grupo control la mediana se encontró de 0.224 (0.04 a 0.60).

Al realizar la comparación entre grupos (Figura 4) encontramos los siguientes aspectos relevantes:

- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de NKT entre los grupos de pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado (p = NS).
- Se encontró una diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) al comparar el porcentaje de células NKT del grupo de pacientes con diabetes tipo 1, con el de familiares de primer grado y controles.

Evaluación de la presencia de linfocitos NKT en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, sus familiares de primer grado y controles.

Figura 4. Comparación entre el porcentaje de NKT en pacientes con diabetes tipo 1, familiares de primer grado y sujetos controles.



P = Pacientes con diabetes tipo 1    C = Controles    F = Familiares de primer grado

## **DISCUSIÓN**

La subpoblación de linfocitos T conocida como células NKT se les ha atribuido un papel en la regulación de la respuesta inmune.

Existen pocos estudios realizados en humanos con diabetes 1 en los que se evalúa esta estirpe celular y los resultados que han brindado han sido controversiales. Se ha propuesto que alteraciones en esta población celular también están implicadas en la destrucción de la célula beta, sin que a la fecha se haya logrado establecer su participación en la patogénesis de la enfermedad, en gran parte debido a la imposibilidad de estudiar directamente el órgano blanco afectado. A diferencia del ratón NOD, la heterogeneidad genética en población humana queda de manifiesto por los resultados obtenidos cuando se han utilizado anticuerpos en contra del receptor invariante de la población NKT, así como tetrámeros de CD1d unidos a  $\alpha$ -galactosilceramida.

Las evaluaciones reportadas desde el punto de vista cuantitativo y funcional sobre esta población celular están representadas por los resultados obtenidos por Wilson SB y cols. y Kukreja A y cols. que muestran que existe una disminución en el número de las células NKT y en su capacidad de secretar de IL-4<sup>48,49</sup>; Lee PT y cols señalan que en pacientes con diabetes tipo 1 hay ausencia de defectos en el número de estas células comparadas con sujetos controles y en riesgo<sup>50</sup>, y Oikawa Y y cols describen un incremento en la frecuencia de estas células<sup>51,52</sup>. Tales resultados difieren entre ellos posiblemente por el tipo de población seleccionada para el estudio, así como el estadio o tiempo de evolución de la enfermedad en los pacientes.

Los resultados que se obtuvieron en nuestro estudio, en donde se evaluó la frecuencia de células NKT en pacientes con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico con menos de 3 meses de evolución y en sus familiares de primer grado y en sujetos controles, utilizando como marcadores de fenotipo de estas células la triple positividad para CD3+ V $\alpha$ 24+ V $\beta$ 11+, mostraron que la frecuencia de estas células en los pacientes con diabetes tipo 1 esta disminuida, tal y como se ha documentado por

Wilson y Kukreja <sup>48,49</sup>. Es de señalarse que Kukreja A y cols. utilizaron dentro de sus marcadores de fenotipo celular los mismos marcadores que empleamos en nuestro estudio, los grupos de comparación los constituyeron pacientes con diabetes tipo 1 (de menos de 3 meses de hecho el diagnóstico [cuya media de edad fue similar a la nuestros pacientes de reciente diagnóstico  $9.4 \pm 2.16$  años y  $9.8 \pm 5$  años, respectivamente] y aquellos de larga evolución) pacientes con diabetes tipo 2 y controles sin antecedentes de algún tipo de diabetes. Sus resultados indicaron que en los pacientes con diabetes tipo 1 de reciente inicio tuvieron un número reducido de células NKT similar a aquellos de larga evolución y menor en comparación con pacientes con diabetes tipo 2 y controles. Además de encontrar el mismo patrón disminuido de citocinas ( $IFN\gamma$  e IL-4) en ambos subgrupos de pacientes con diabetes tipo 1 al compararlo con los controles.

Aunque Oikawa y cols. <sup>51,52</sup> utilizan el mismo patrón de identificación del fenotipo para las células NKT que el que usamos nosotros (la triple positividad para  $CD3^+ V\alpha24^+ V\beta11^+$ ), ellos concluyen dos aspectos relevantes: el primero de ellos es que la media de la frecuencia de células  $V\alpha24$ ,  $V\beta11$  es mayor en los pacientes con diabetes tipo 1 comparada con la de sujetos sanos (0.112 Vs 0.065); el segundo establece una relación directamente proporcional entre la frecuencia de NKT y el tiempo de evolución de la enfermedad; lo anterior contrario a nuestros resultados. Sin embargo, debemos considerar que su trabajo fue realizado en sujetos adultos, pero sobre todo de nacionalidad japonesa, lo cual posiblemente sea una razón para generar discrepancia en los resultados al ser comparados con los sujetos en otros estudios como el nuestro, e inclusive, el mismo autor pone a consideración este aspecto.

Si bien es cierto que Lee PT y cols. <sup>50</sup> demostraron que no existían defectos cuantitativos y/o funcionales en esta subpoblación celular, ellos utilizaron otro tipo de marcadores para la identificación de células NKT en pacientes con diabetes tipo 1, pacientes con anticuerpos positivos (y que ellos los llaman pacientes pre-diabetes tipo 1) y controles. Ellos utilizaron un método que se basó en el uso combinado de tetrámeros  $CD1d-\alpha GalCer$  de ratón y el anticuerpo monoclonal anti- $V\alpha24$ . En relación a ello, Poulton LD y cols. <sup>41</sup> recientemente demostraron que la combinación  $V\alpha24$  y  $V\beta11$

es un excelente marcador subrogado para la identificación de NKT, comparable con los tetrámeros de CD1d cargados con  $\alpha$ GalCer, lo cual da validez a los trabajos que emplean estos métodos de detección.

Un aspecto importante de nuestro estudio lo constituye el que la frecuencia de células NKT en el grupo de pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares de primer grado es similar ( $p > 0.05$ ); esto nos permite inferir que estos dos grupos podrían tener un comportamiento similar desde el punto de vista de inmunidad celular, y de la frecuencia de la población inmunorreguladora de células NKT. Este hecho, permite presuponer que además de los factores genéticos ya conocidos que determinan un riesgo mayor a desarrollar la enfermedad, es posible que exista alguna alteración inmunológica definida que, en el contexto de los factores ambientales propicios, hace que comience la reacción de autoinmunidad contra las células  $\beta$  del páncreas.

Las discrepancias en los estudios publicados hasta el momento podrían deberse en gran parte a la carencia de marcadores que permitan identificar el estado activado de las células NKT; es decir, el poder evaluar el estado funcional de éstas células, siendo esta área un campo enorme en el área de investigación.

La importancia de estos hallazgos estriba en que nos permite ampliar al conocimiento sobre los aspectos inmunológicos de la enfermedad, da sustento a la utilización de CD3+ V $\alpha$ 24+ V $\beta$ 11+ como marcadores de identificación de células NKT con el objeto de obtener las bases para realizar el seguimiento de las familias a largo plazo y poder evaluar el desenlace de diabetes tipo 1 y así obtener un posible marcador predictivo de la enfermedad para identificar a familiares de primer grado en riesgo.

Hasta el momento actual no existe un marcador que permita establecer el estado funcional de esta estirpe celular; a este respecto se ha identificado una molécula denominada CRTAM (Class I Restricted T Cell Associated Molecule) que al parecer se expresa solo en las células CD8, NKT DN y NKT CD4+ y la cual podría ser útil como marcador. Es por ello que a futuro hemos planeado realizar una segunda fase de este trabajo de investigación en la cual se pretende evaluar la presencia de células NKT que expresen la molécula CRTAM+ y establecer su relación con los anticuerpos que se han

Evaluación de la presencia de linfocitos NKT en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, sus familiares de primer grado y controles.

asociado a un mayor riesgo de presentar la enfermedad (anti-GAD65, anti-IA2, anti-insulina). El utilizar esta molécula como marcador de activación nos podría permitir identificar la activación de estas células mucho antes de que inicie el daño tisular en la historia natural de la diabetes tipo 1; siendo esto, un área que a futuro puede proveer información valiosa para la mejor comprensión de la enfermedad y para el surgimiento de técnicas de prevención y/o tratamiento.

## **CONCLUSIONES**

Nuestro estudio demuestra que existen diferencias cuantitativas significativas de la población de células NKT a través de su receptor invariante al utilizar anticuerpos anti-CD3, anti-V $\alpha$ 24 y anti-V $\beta$ 11 en los pacientes con diabetes tipo 1, sus familiares de primer grado y sujetos controles.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. American Diabetes Association. Diabetes Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care* 2007; 30: S42-47.
2. Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27:1047–53
3. Organización Panamericana de la Salud. La Diabetes en las Américas. *Boletín Epidemiológico/OPS* 2001; 22: 1-3
4. The DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999. *Diabetic Medicine* 2006; 23: 857-866
5. Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, et al. For the World Health Organization DIAMOND Project Group. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 883-92.
6. Robles VC, Cornejo BJ, Dorantes AL, et al. Actualización del registro de diabetes mellitus tipo I Grupo Ciudad de México. *Memorias XXIX Reunión Anual, Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología A.C.* Acapulco, Gro. Nov. 1989: 19.
7. Notkins AL. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem* 2002; 277: 43545-43548.
8. She JX, Marron MP. Genetic susceptibility factors in type 1 diabetes: linkage, disequilibrium and functional analyses. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 682-9
9. She JX. Susceptibility to type 1 diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today* 1998; 17: 323-9.
10. Erlich HA, Zeidler A, Chang J, et al. HLA class II alleles and susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus in Mexican-American families. *Nat Genet.* 1993; 3: 358-64
11. Godoresky C, Olivares A, Debezo H, et al. MHC-dependent molecular mechanisms of susceptibility and protection in type 1 diabetes in mexicans. *Gac Med Mex* 1995;131:395-402

12. Dorman J, LaPorte R, Trucco M. Worldwide differences in the incidence of type I diabetes are associated with aminoacid variation at position 57 of the HLA-DQ beta. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 7370-4
13. Khalil I d'Auriol L, Gobet M, Morin L, et al. A combination of HLA-DQ beta Asp-57 negative and HLA-DQ alpha Arg-52 confers susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990; 85: 13-15
14. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unsolved issues. *J Clin Invest* 2001; 108: 1247-52
15. Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, et al. The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25 years review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 1986; 29: 267-74.
16. Hannirn A, Jalkanen S, Salmi M, et al. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992; 90: 1901-10.
17. Imagawa A, Hanafusa T, Tamura S, et al. Pancreatic biopsy as a procedure for detectin in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes. Close correlation between serological markers and a histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes* 2001; 50: 1269-73.
18. Rabinovitch A, Soares-Pinzon WL, Sorensen O, et al. INF- $\gamma$  gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1995; 154: 4878-82.
19. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. Insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in ma-macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol* 1991; 165: 97-103.
20. Wong SF, Janeway CA. Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 643-47.
21. Mueller R, Krahl T, Sarvetnick N. Pancreas expression of interleukin-4 abrogates insulitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 1996; 184: 1093-99

22. Cameron MJ. IL-4 prevents insulinitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory helper Th2 cell function. *J Immunol* 1997; 159: 4686-92.
23. Tian J, Lehmann PV, Kaufman DL. Determinant spreading of T helper cell 2 (Th2) response to pancreatic islet autoantigens, *J Exp Med* 1997; 186: 2039-43.
24. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995; 268: 1185-88
25. Pakala SV, Kurrer MO, Katz JD. T helper 2 (Th2) cell induces acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 1997; 186: 299-306.
26. Poulin M, Haskins K. Induction of diabetes in nonobese diabetic mice by Th2 T cell clones from a TCR transgenic mouse. *J Immunol* 2000; 164: 3072-78
27. Hawa MI, Fava D, Medici F, et al. Antibodies to IA-2 and GAD 65 in type 1 and type 2 diabetes. Isotype restriction and polyclonality. *Diabetes Care* 2000; 23: 228-33.
28. Salomon B, Lenschow DL, Rhee L, et al. B7/Cd28 costimulation is essential for the homeostasis and the CD4CD25 immunoregulatory T cell that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000; 12: 431-40.
29. Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, et al. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 1982; 298: 167-9.
30. Leisle D, Lipsky P, Notkins AL. Autoantibodies as predictors of disease. *J Clin Invest* 2001; 108: 1417-22.
31. Martin S, Wolf-Eichbaum D, Dunkerken G, et al. Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-cell deficiency. *N Engl J Med* 2001; 345: 1036-40.
32. Budd RC, Miescher GC, Howe RC, et al. Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *J Exp Med* 1987; 166: 577-82

33. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, et al. A novel population of T-cell receptor  $\alpha\beta$ -bearing thymocytes, which predominantly expresses a single V $\beta$  gene family. *Nature* 1987; 329: 251-4
34. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, et al. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4<sup>-</sup>8<sup>-</sup>  $\alpha\beta$  T cells demonstrates preferential use of several V $\beta$  genes and an invariant TCR  $\alpha$  chain. *J Exp Med* 1993; 178: 1–16.
35. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor  $\alpha$  chain is used by a unique subset of MHC class I-specific CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup>8<sup>-</sup> T cells in mice and humans. *J. Exp. Med* 1994; 180: 1097–106
36. Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2 : 557-68.
37. Baxter AG, Hammond KJ, Scollay R, et al. Association between alphabeta TCR+CD-CD- Te-cell deficiency and IDMM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 1998; 46: 572-82.
38. Hammond KJ, Lynn D, Poulton LD, et al. A/b- T cell receptor (TCR)+CD-CD- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 1998; 187: 1047-56.
39. Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, et al. Overexpression of natural killer T cells protects Va14-Ja281 transgenic nonobese mice against diabetes. *J Exp Med* 1998; 188: 1831-9
40. Falcone M, Brian Y, Tucker L, et al. A defect in interleukin 12-induced activation and interferong secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanism for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1999; 190: 963-72.
41. Poulton LD, Baxter AG. Clinical application of NKT cell assays to the prediction of type 1 diabetes. *Hum Immunol.* 2002; 63: 256-70.

42. Berzins SP, Kyparissoudis K, Pellicci DG, et al. Systemic NKT cell deficiency in NOD mice is not detected in peripheral blood: implications for humans studies. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82:247-52
43. Dardenne M, Lepault FB, Bach JF. Acceleration of the onset of diabetes in NOD mice by thymectomy at weaning. *Eur J Immunol* 1989; 9: 889-95
44. Moitard C, Yasunami R, Dardenne M, et al. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes NOD mice. *J Exp Med* 1989; 169: 1669-80
45. Yang Y, Bao M, Yoon JM. Intrinsic defects in the T-cell lineage results in natural killer T-cell deficiency and the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse *Diabetes* 2001; 50: 2691-9
46. Wagner MJ, Hussain S, Mehan M, et al. A defect in lineage fate decision during fetal thymic invariant NKT cell development may regulate susceptibility to type 1 diabetes. *J Immunol* 2005; 174: 6764-71
47. Griseri T, Beaudoin L, Novak J, et al. Invariant NKT cells exacerbate type 1 diabetes induced by CD8 T cells. *J Immunol* 2005; 175: 2091-101
48. Wilson SB, Kemt SC, Patton KT, et al. Extreme Th1 bias of invariant V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998; 391: 177–81
49. Kukreja A, Cost G, Marker J, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type 1 diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109: 131-40.
50. Lee PT, Putnam A, Benlagha K, et al. Testing the NKT Cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest* 2002; 110: 793-800
51. Oikawa Y, Shimada A, Yamada S, et al. NKT cell frequency in japanese type 1 diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003;1005: 230-32.
52. Oikawa Y, Shimada A, Yamada S, et al. High frequency of V $\alpha$ 24 V $\beta$ 11 T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25 :1818-23.
53. Kennedy J, Vicari AP, Saylor V, et al. A molecular analysis of NKT cells: identification of a class-I restricted T cell-associated molecule (CRTAM). *J Leukoc Biol* 2000; 67: 725-34