

IDENTIFICACIÓN DE LOS PERFILES INMUNOLÓGICOS E INFLAMATORIOS RELACIONADOS CON LA PROGRESIÓN DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SUS COMPLICACIONES ASOCIADAS

Francisco Martín Loro

Directores de tesis:

Dra. Ana I. Arroba Espinosa

Dr. Manuel Aguilar Diosdado

Programa de doctorado
Ciencias de la Salud

Cádiz, 2026

INFORME FAVORABLE DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA EL DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL DESARROLLADA DE ACUERDO CON EL REAL DECRETO 99/2011, DE 28 DE ENERO.

El Dr. Manuel Aguilar Diosdado, Catedrático del Área de Medicina de la Universidad de Cádiz y Jefe de la Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Puerta del Mar (Cádiz), y la Dra. Ana Isabel Arroba Espinosa, Investigadora Biomédica "Nicolás Monardes" de la Consejería de Salud y vinculada a la Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario Puerta del Mar (Cádiz),

CERTIFICAN:

Que le presente trabajo de investigación titulado: "IDENTIFICACIÓN DE LOS PERFILES INMUNOLÓGICO E INFLAMATORIOS RELACIONADOS CON LA PROGRESIÓN DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y SUS COMPLICACIONES ASOCIADAS", que presenta Francisco Martín Loro para la obtención del título de doctor, ha sido realizada en la Universidad de Cádiz, en el Instituto de Investigación e Innovación Biomédica de Cádiz, y en el Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz, bajo la dirección de los doctores D. Manuel Aguilar Diosdado y Dª. Ana Isabel Arroba Espinosa, y cumple los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, se expide y firma la presente certificación en Cádiz, 23 de marzo de 2025.





Fdo. Manuel Aguilar Diosdado
Director

Fdo. Ana I. Arroba Espinosa
Directora

Agradecimientos

Quisiera comenzar estos agradecimientos expresando mi más sincero aprecio a mis directores de tesis, la Dra. Ana I. Arroba Espinosa y el Dr. Manuel Aguilar Diosdado, por haber depositado su confianza en mí y permitirme formar parte de este proyecto y acompañarme a lo largo de este camino, que, aunque a veces puede ser frustrante, tedioso y no exento de dificultades, gracias a su dedicación, paciencia, generosidad y los consejos que me dieron, lo hicieron muchísimo más llevadero y ameno. Gracias por siempre preocuparse de mi bienestar y por transmitirme no solo sus conocimientos sino también valores fundamentales para el trabajo investigador como la perseverancia y la curiosidad intelectual.

Me gustaría también expresar mi más profundo agradecimiento a todos los pacientes y voluntarios que participaron en los diferentes estudios que conforman esta tesis doctoral, ya que, sin su generosidad, contribución y disposición para colaborar hubiera sido imposible llevar a cabo este trabajo, contribuyendo al avance de la ciencia y que de esta forma en un futuro se pueda mejorar la calidad de vida de personas que enfrenten situaciones similares. Asimismo, quiero hacer extensivo este agradecimiento a todos los profesionales del Hospital Puerta del Mar especialmente al servicio de Endocrinología y Oftalmología, cuya implicación, profesionalidad y dedicación han sido esenciales durante todo el proceso de desarrollo de esta tesis doctoral.

Al Dr. Pedro de la Villa Polo le agradezco enormemente por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme la oportunidad de aprender en un entorno muy enriquecedor. Gracias por su guía constante y compartir generosamente sus conocimientos conmigo. Su entusiasmo por la investigación y compromiso con la enseñanza fueron para mí una valiosa fuente de inspiración. Quiero extender mi agradecimiento a todos los miembros de su laboratorio: Alicia, Cecilia, Francisco, Mateo, Santiago y Víctor muchísimas gracias de corazón por vuestro apoyo, paciencia, compañerismo y la calidez con la que me acogisteis desde el primer día, haciéndome sentir como uno más del laboratorio, haciendo la estancia tan agradable y productiva.

A mi familia, por ser mi refugio y por todo su apoyo incondicional durante todos estos años. A mi madre Francisca por escucharme siempre, estar ahí y ofrecerme su guía en los malos momentos. A mi hermano Mateo por los buenos momentos que hemos pasado juntos. A mi padre Francisco que, aunque ya no esté con nosotros, nunca olvidare sus consejos, su amor por los animales y su carácter, su humor... Siempre te querré papá, estés donde estés, espero que puedas estar orgulloso de todo lo que he logrado desde que nos dejaste.

A mi perrito Kimbo, el perrito más bueno y cariñoso que una persona podría desear.

También me gustaría agradecer de corazón a mis compañeras del grupo de investigación CO17 o Lab 5 MAD, por todos estos maravillosos años de trabajo en equipo. Laura y Mary, gracias por vuestra infinita paciencia conmigo y estar siempre dispuestas a resolver cualquier duda o problema, gracias a vosotras he aprendido muchísimo no solo en lo profesional, sino también como persona. Fátima, compañera de fatigas en el laboratorio para los buenos y los malos momentos, gracias de todo corazón, porque sin ti este viaje hubiese sido muchísimo peor. A Carmen, Elena y Belén, por los buenos momentos que hemos pasado juntos en el laboratorio y vuestra ayuda incondicional.

A mis compañeros del INiBICA: quisiera agradecer a todas mis compañeras y compañeros que han formado parte de la Unidad de Investigación y que han ido y venido a lo largo de los años. Cada uno de vosotros habéis sido de una gran ayuda, y juntos habeis creado un ambiente cálido donde siempre hay espacio para reír, compartir y celebrar. A Denisse, gracias por mejorar el día con tu sonrisa y tu humor y esas preguntas que siempre nos hacen pensar, te echamos de menos… ¡QUE VIVA MÉXICO! A Javier y Florencia gracias por su buen carácter, alegría y esas quedadas para tomar algo después del trabajo que tanto nos hacen disfrutar. Gema, Fernando, Raúl, Paloma, Raquel, Estefanía, Cuca, María, Loli, Begoña, Alejandra, Rocío y Marina muchas gracias por estar siempre ahí y vuestro apoyo. Poder trabajar junto a vosotros no solo ha sido un placer sino un verdadero regalo.

A mis amigos, Alba, Alejandro Segura, Alejandro Velasco Andrés, Antonio, Carlos, Clara, Cristina, Daniel, Fran, Francisco Javier, Juan Diego, Luis Miguel, Rafa, Norberto y Yohaire

A Alejandro Segura, Daniel y Juan Diego, amigos desde que tengo uso de razón. Gracias por esas quedadas para jugar al Catán o al Monopoly, mientras nos comemos unas pizzas que me dan la vida.

A Antonio, Clara, Fran y Luis Miguel os doy las os doy las gracias con toda mi alma por siempre estar ahí y vuestros consejos y apoyo, y esas quedadas para tomar algo, jugar juegos de mesa y charlar. Sois personas extraordinarias, de las que dejan huella, y me siento verdaderamente afortunado de haber tenido el placer de conocer en este mundo. La vida hubiese sido mucho más dura, y sin vosotros y sin lugar a dudaos no habría sido lo mismo.

A Alba, Alejandro Velasco, Andrés, Carlos, Cristina, Francisco Javier, Rafa, Yohaire y Norberto, los ¨Cordobeses¨, compañeros desde que empecé la universidad en el 2013: No existen suficientes palabras ni este ni en ningún otro idioma para agradeceros todo lo que habéis significado durante todos estos años; habéis sido como una familia, con la he crecido, reído y compartido algunos de los momentos más bonitos de mi vida. Esa maravillosa convivencia durante 5 años en Córdoba, esas quedadas para ver películas, las maravillosas noches de Eurovisión, las partidas de Rol y de Magic y por cada unos de los viajes que hemos realizado por España, especialmente a la preciosa Bierge que atesoro con un inmenso cariño. Todo ello formara parte siempre de quien soy, no sabéis lo que aprecio poder teneros en mi vida, siempre tendréis un hueco en mi corazón. Por muchísimos más años juntos, llenos de planes, viajes, risas y momentos inolvidables

Financiación:

1. *"La inmunomodulación es una nueva diana terapéutica de la diabetes mellitus tipo 1. Uso de sp2-iminoglicolípidos como tratamientos*". Convocatoria de proyectos I+D+I en Salud. Instituto Salud Carlos III. (**PI22-01718**). IPs: Manuel Aguilar y Ana I. Arroba.

2. "*Identificación del patrón de proteínas relacionada con la progresión de la diabetes mellitus tipo 1 y complicaciones asociadas: Diabetomics*". Subvenciones en régimen de concurrencia competitiva, para la financiación de la investigación, desarrollo e innovación (i+d+i) en biomedicina y en ciencias de la salud en Andalucía para el año 2020. (**PI20-0036**) IP: Manuel Aguilar y M. Mar Roca

3. "*Determinación de la inflamación temprana como una nueva diana terapéutica en el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus y sus complicaciones. el uso de productos naturales bioactivos de origen marino*". Convocatoria de subvenciones para la financiación de la investigación y la innovación biomédica y en Ciencias de la Salud en el marco de la iniciativa territorial integrada 2014-2020 para la provincia de Cádiz. Consejería de Salud. Junta de Andalucía. FEDER. (**ITI-0012-2019**). IP: Ana I. Arroba.

Índice

Abreviaturas

Índice de figuras

Índice de tablas

1. Resumen
2. Introducción……1
   2.1 Definición de la diabetes mellitus…….3
   2.2 Factores genéticos…….4
   2.3 Sistema inmune…….7
      2.3.1 Pérdida de la tolerancia antigénica……...9
      2.3.2 Autoanticuerpos……..11
      2.3.3 Contribución del sistema inmune a los procesos apoptóticos en células β.12
      2.3.4 Participación de citoquinas en la respuesta inmunitaria de las células β durante la DM1…….……..…17
   2.4 Complicaciones asociadas a la DM1. Efectos de la respuesta inmune..…….20
      2.4.1 Nefropatía diabética……..……..21
      2.4.2 Neuropatía diabética……...……22
      2.4.3 Problemas cardíacos……...…23
      2.4.4 Retinopatía diabética……..24
   2.5 Biomarcadores…….26
      2.5.1 Ómicas y su utilidad en la detección de biomarcadores en la DM1…...…28
   2.6 Potencial de los productos naturales de origen marino en la prevención de la DM1 y sus complicaciones…….……..…….……..29
3. Justificación……..…….33
4. Hipótesis y objetivos .....……...……..…39
5. Estudios……...……..46
   5.1 Estudio I: Identificación de los cambios en las subpoblaciones de células inmunes periféricas durante la progresión de la diabetes mellitus tipo 1……48
      Resumen……..48
      Abstract……50
      Material and methods…….…….51
         Study participants…….……51
         PBMCs isolation…….……..51
         Cell labeling and Flow cytometry……51

mRNA extraction and quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) analysis…….…….52

In vitro treatment PBMCs…….52

Study approval and participant consent procedures……...……..52

Statistical analysis…….…….…...53

Results…….53

Demographic characteristics…….……53

Cellular composition alterations in peripheral immune cells in DM1…...…..54

Upregulated expression of *TBX21*; *FOXP3* and *RORCT* in PBMCs of Advandce-stage DM1 group…….……...…….…….56

Inflammatory gene expression profiles during DM1 progression…....…….57

Correlations between immune cells subpopulations and molecular regulators……..……...58

M9 treatment modulates immune responses and cytokine expression profiles……..……...……..59

Discussion…….……..…….60

Study limitations……..……62

Supplementary material……..……63

5.2 Estudio II: Perfil dinámico de citoquinas en pacientes de diabetes mellitus tipo 1 desde su inicio hasta estadios avanzados; Su potencial participación en el desarrollo de retinopatía diabética …….……...….…....67

Resumen……..……...…….67

Abstract……69

Material and methods…….……70

Study participants…….……70

Ethics…….……...70

Serum cytokine analysis…….……..70

SD-OCT evaluations……..……71

Statistics……72

Results…….72

Characteristics of the study population……72

Analysis of serum cytokines…….73

Pro-inflammatory cytokines……..74

Anti-inflammatory cytokines……74

Chemokines……...76

Growth factors……...76

Retinal affectation and identification of hyperreflective foci in late stages of DM1……..……77

Correlations between retinal parameters and cytokine patterns……...78

The predictive value of serum IL-8 and IL-2Ra in the onset of DM1 reveals the prognosis of retinal alterations……78

Discussion……80

Study limitations……..83

Supplementary material……...……84

5.3 Estudio III: Firma proteómica inflamatoria en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diabetes mellitus tipo 1: Un patrón diferencial de expresión……..87

Resumen……...……...87

Abstract……89

Material and Methods……..……89

Study participants……..……...89

Analytical variables……..……90

SD-OCT evaluations……...……..90

Approval, registration and participant consent procedures……..……91

Serum cytokine analysis…….……91

PBMCs isolation……..……91

Proteomic analysis…….…….……..92

Data processing and statistical rationale……..……93

Results……..……...94

Clinical characteristics of serum samples and proteomic profiles assessments……..……..94

Differential expression patterns between common proteins of the Early and Advanced-stage DM1 patient groups…….……96

Differential protein expression patterns in Early and Advanced-stage DM1 groups……..……..……..101

Early and Advanced-stage DM1 groups present differences in several functional and disease related pathways……...……103

Clinical features and their correlation with DEPs……..105

The predictive value of CBL as a differential diagnosis for DM1 immunological status and HRG as a potential biomarker for the diabetic complication´s development……..106

Discussion…….……107

Study limitations…….……..……113

Supplementary material……..…113
6. Discusión general……..……..119
7. Conclusiones……127
8. Bibliografía de introducción y discusión general……133
9. Anexos…….162

Índice de abreviaturas

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

ICA: Islet-cell Antibody

GAD: Glutamic acid decarboxylase

MHC: Major Histocompatibility Complex

IDDM: Insulin dependent diabetes mellitus

TNF: Tumor necrosis factor

IFN: Interferón

GADA: Glutamic acid descarboxylase autoantibodies

GAD: Glutamic acid descarboxylase

Treg: Células T reguladoras

Th: Células T helper

ICA: Islet cell autoantobodies

IAA: Insulin autoantibodies

IA-2A: Protein-tyrosine phosphatase autoantibodies

ZnT8A: Zinc transporter-8 autoantibodies

Th: Células T helper

NK: Células Natural Killer

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible

NO: Óxido nítrico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

AGEs: Productos de glicación avanzada

RD: Retinopatía diabética

ND: Nefropatía diabética

NDP: Neuropatía diabética periférica

BHR: Barrera hemato-retiniana

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells

M9: 3-(2,4-dihidroxyphenyl)phthalide

SD-OCT: Tomografía de coherencia óptica de dominio espectral

OCTA: Angiografía por tomografía de coherencia óptica

DEP: Diferentially expressed protein

IPA: Ingenuity Pathway Análisis

FAZ: Zona Avascular Foveal

HRF: Hyper-reflective foci

ROC: Receiver Operating Characteristic

AUC: Area under the curve

SCP: Superficial capillary plexus

HbA1c/A1c: Hemoglobina glicosilada

LFQ: Label-free quantification

Índice de figuras

Introducción

Figura 1. Gen del HLA y otros genes implicados en el desarrollo de la DM1....5

Figura 2. Pérdida de la tolerancia antigénica……..10

Figura 3. Tipos de macrófagos……...……16

Figura 4. Destrucción de células beta en DM1……...……...…….19

Figura 5. Mecanismos de quiescencia y activación microglial……..26

Estudio I

Figure 1. Flow cytometry analysis of $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, B cells, NK cells and monocytes in PBMCs from individuals with DM1 and the healthy controls……55

Figure 2. Inflammatory profile of PBMCs during DM1 progression…….…....58

Figure 3. M9 modulated immune responses in PBMCs derived from DM1 patients……..…….…..59

Supplementary Figure 1. M9 induces immunomodulation in PBMCs from healthy donors……..……..……..65

Supplementary Figure 2. PBMCs stimulation by LPS…….……66

Estudio II

Figure 1. Levels of pro (A) and anti-inflammatory (B) cytokines in serum…...75

Figure 2. Representative Spectral Domain Optical Coherence Tomography.…77

Figure 3. Predicting the prognosis of DR using serum cytokines levels……79

Estudio III

Figure 1. Experimental workflow……..…….94

Figure 2. Proteomic study population clustering……..……..97

Figure 3. Altered pathways in PBMCs from Early and Advanced-stage groups……..……98

Figure 4. Changes in differential proteins in Early and Advanced-stage DM1 groups……102

Figure 5. Functional analysis comparison between Early and Advanced-stage DM1 groups……...……104

Figure 6. Heat-map of significant modulation of proteins in DM1 groups compares to clinical parameters……106

Figure 7. Predicting the prognosis of differential immunological status in DM1 using CBL and HRG protein expression……..107

Índice de Tablas

Estudio I

Table 1. Diabetes-specific characteristics of DM1 and healthy groups…..…..53

Table 2. Alterations in immunological cell subpopulations in peripheral blood among healthy and DM1 stratified by disease stage……..…….55

Table 3. Relative expression of different genes associated with immune cell subset in PBMCs from healthy and DM1 patients……..……57

Supplementary Table 1. Cell surface staining antibodies……....…63

Supplementary Table 2. Primer-probe test……..….64

Supplementary Table 3. Spearman´s rank correlation coefficients among the variables……..…..…64

Estudio II

Table 1. Study population profile: Demographic, biochemical, cellular and ophthalmic data…….……..…….…….73

Supplementary Table 1. Serum cytokine levels in the study participants…....84

Supplementary Table 2. Comparison of cytokines in serum between C and D groups and correlations between cytokines and OCT determinations…..……..85

Supplementary Table 3. Comparison of circulating cytokines in DM1 groups as predictors of DR……..……85

Estudio III

Table 1. Main characteristics of the cohort of healthy and DM1 patients…....95

Table 2. Functional classification of proteins changes due to immunological or inflammatory systems……....……...100

Supplementary tables 1-6 link……113

Supplementary table 7. Clinical features in the DM1 group and their correlation with DEPs……..……..114

Supplementary table 8. PBMCs mRNA expression……..115

Supplementary table 9. Receiver operating characteristic analysis in DM1 and Healthy groups…….……..117

1. Resumen

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmunitaria crónica caracterizada por la destrucción selectiva de las células β-pancreáticas productoras de insulina, localizadas en los islotes de Langerhans. Esta pérdida conduce a una deficiencia absoluta de insulina y, en consecuencia, a una hiperglucemia sostenida. La DM1 representa entre el 5-10% de todos los casos de diabetes y suele manifestarse en la infancia o adolescencia, aunque puede aparecer a cualquier edad. Su etiología es multifactorial, involucrando una compleja interacción entre predisposición genética, factores ambientales y disfunción inmunitaria.

Desde el punto de vista inmunológico, la patogenia de la DM1 se inicia con la presentación de antígenos derivados de las células β a través de las células dendríticas y los macrófagos. La respuesta autoinmune mediada por el reconocimiento de estos antígenos por los linfocitos T, requiere de la participación de distintas citoquinas que inducen el perfil Th1 o reactivo de los linfocitos T. Esta producción de citoquinas contribuye a generar el ambiente necesario para activar la respuesta citotóxica de los macrófagos sobre las células β. Paralelamente, se generan autoanticuerpos frente a antígenos específicos como GAD65, IA-2 e insulina, que sirven como marcadores serológicos de autoinmunidad.

En contraste, la participación de linfocitos Th2, favorece un papel más regulador y antiinflamatorio. No obstante, en la DM1 predomina un desequilibrio de las poblaciones linfocitarias e inmunes, lo que perpetúa la inflamación crónica y el daño tisular.

A nivel inflamatorio, el islote pancreático de pacientes con DM1 muestra infiltración linfocitaria (insulitis), producción elevada de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-1β, IFN-γ) y activación de vías de estrés oxidativo. Estos procesos amplifican la muerte celular y la exposición de nuevos autoantígenos, alimentando un ciclo autoinmunitario permanente.

En conjunto, la DM1 representa un modelo paradigmático de autoinmunidad mediada por células, donde la interacción entre genética, inmunidad e inflamación culmina en la pérdida irreversible de la función pancreática endocrina.

Los cambios sistémicos inmunes detectados a lo largo del progreso de la DM1, no solo afectan al páncreas endocrino, como órgano diana de la enfermedad; si no que las complicaciones asociadas a la DM1 pueden verse influenciadas por estas respuestas tempranas, condicionando su aparición, así como su progresión. Debido al interés de los procesos descritos en el desarrollo y progresión de la DM1, así como su relación con el desarrollo de la retinopatía diabética, esta tesis ha sido estructurada en tres estudios

interconectados, que abordan aspectos inflamatorios, inmunológicos y potencialmente terapéuticos en cada uno de ellos, como se expone en los siguientes apartados:

En el primer estudio se analizaron los cambios inmunológicos en PBMCs de pacientes con DM1 mediante citometría de flujo y análisis génico. Se detectaron alteraciones en la composición celular, con aumento de linfocitos T $CD4^+$, disminución de T $CD8^+$ y NK, y un patrón bifásico en las células Th17. A nivel molecular, se observó una polarización inmunitaria caracterizada por alta expresión de *RORCT* y *FOXP3*, junto con la persistencia de *TNFB* e *IFNG* y variaciones en IL-1B e IL-8. Además, genes antiinflamatorios como *ARG1* y *HMOX1* se sobre expresaron en etapas iniciales, sugiriendo mecanismos compensatorios.
El tratamiento con un compuesto sintético, que se fundamenta en estructuras de origen marino (M9), redujo los niveles de expresión de mediadores proinflamatorios e indujo una respuesta antiinflamatoria. En conjunto, los resultados indican que la DM1 progresa mediante un equilibrio dinámico entre respuestas inflamatorias y reguladoras, y que nuevas moléculas bioactivas podrían tener un valor terapéutico inmunomodulador.

En el segundo estudio se evaluaron 74 pacientes con DM1 divididos según la duración de la enfermedad (A: <3 meses; B: 3 meses-1 año; C: 1-5 años; D: >5 años) y 23 controles sanos. Se analizaron niveles séricos de citoquinas pro y antiinflamatorias, parámetros bioquímicos y características retinianas mediante tomografía de coherencia óptica (OCT). Los resultados mostraron un aumento de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, TNF-α, IL-18, IL-12Ra, IL-8, MCP-1, MIF, IP10, M-CSF) en etapas iniciales (grupo A) y una combinación de citoquinas proinflamatorias (Eotaxina, IL-8, IL-2Ra, MCP-1, MIG, IL-12(p70), IL-17) y antiinflamatorias (IL-4, LIF) en fases intermedias (grupo C). Además, se observó una correlación entre los niveles de citoquinas proinflamatorias y signos tempranos de RD, como el adelgazamiento retiniano y el aumento del área avascular foveal y la neovascularización en los grupos C y D.
En conjunto, los perfiles de citoquinas identificados reflejan una evolución inmunológica dinámica durante la DM1 y podrían servir como biomarcadores inmunes útiles para mejorar el diagnóstico, pronóstico y manejo clínico de la enfermedad y sus complicaciones oculares.

En el tercer estudio se analizaron los mecanismos asociados a su progresión, para ello se estudiaron pacientes divididos en dos grupos según la duración de la enfermedad: Early (≤12 meses) y Advanced (>12 meses), junto con un grupo control sano (H).
Mediante análisis proteómico de PBMCs y cuantificación sérica de mediadores inflamatorios, se identificaron proteínas diferencialmente expresadas implicadas en el transporte vesicular, la respuesta inmune y el metabolismo. Varias proteínas asociadas a la vía de señalización de IL-12 en macrófagos (APOA2, APOC1, APOC3, PON1, AAK1 y CBL) mostraron una regulación negativa. Los niveles séricos de IL-12 fueron significativamente mayores en el grupo Early respecto al control (p<0.001), mientras que en el grupo Advanced solo se observó una tendencia al alza.

La proteína CBL se propuso como un marcador del estado inmunológico durante la progresión de la DM1, y HRG como un biomarcador potencial de complicaciones secundarias, como la retinopatía diabética. En conjunto, estos resultados aportan información clave sobre los mecanismos inmuno-metabólicos de la enfermedad y podrían guiar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas.

En conjunto, los resultados de este trabajo evidencian que la progresión de la DM1 está marcada por una interacción dinámica entre mecanismos inflamatorios y reguladores del sistema inmunitario. Los perfiles específicos de citoquinas y proteínas identificados no solo reflejan el estado inmunológico en las distintas etapas de la enfermedad, sino que además se perfilan como biomarcadores potenciales para mejorar el diagnóstico, el pronóstico y la prevención de complicaciones secundarias como la retinopatía diabética.

Asimismo, la respuesta positiva observada frente a compuestos bioactivos con propiedades inmunomoduladoras sugiere un potencial terapéutico prometedor orientado a modular la inflamación, optimizar el manejo clínico y favorecer mejores resultados a largo plazo en pacientes con DM1.

Abstract

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is a chronic autoimmune disease characterized by the selective destruction of insulin-producing pancreatic β-cells located within the islets of Langerhans. This loss results in absolute insulin deficiency and, consequently, sustained hyperglycemia. DM1 accounts for approximately 5-10% of all diabetes cases and typically manifests during childhood or adolescence, although it may occur at any age. Its etiology is multifactorial, involving a complex interplay among genetic predisposition, environmental factors, and immune dysfunction.

From an immunological perspective, the pathogenesis of DM1 begins with the presentation of β-cell–derived antigens by dendritic cells and macrophages. The ensuing autoimmune response, mediated by T-lymphocyte recognition of these antigens, requires the participation of cytokines that promote a Th1-type or proinflammatory T-cell profile. This cytokine production contributes to creating an environment that enables macrophage-mediated cytotoxic activity against β-cells. In parallel, autoantibodies targeting antigens such as GAD65, IA-2, and insulin are generated and serve as serological markers of autoimmunity.

In contrast, the involvement of Th2 lymphocytes favors a more regulatory and anti-inflammatory role. However, in DM1, an imbalance among lymphocyte and immune cell populations predominates, perpetuating chronic inflammation and tissue damage.
At the inflammatory level, the pancreas of individuals with DM1 exhibits lymphocytic infiltration (insulitis), increased production of proinflammatory cytokines (TNF-α, IL-1β, IFN-γ), and activation of oxidative stress pathways. These processes amplify cell death and the exposure of new autoantigens, fueling a persistent autoimmune cycle.
Altogether, DM1 represents a paradigmatic model of cell-mediated autoimmunity, in which interactions among genetics, immunity, and inflammation culminate in irreversible loss of endocrine pancreatic function.

Systemic immune changes detected throughout the progression of DM1 not only affect the pancreas as the primary target organ but may also influence DM1-associated complications, conditioning their onset and progression. Owing to the relevance of these

processes in the development and progression of DM1 and their relationship with diabetic retinopathy, this thesis is structured into three interconnected studies that explore inflammatory, immunological, and potentially therapeutic aspects, as outlined below:

In the first study, immunological changes in PBMCs from DM1 patients were analyzed by flow cytometry and gene expression profiling. Alterations in cellular composition were detected, including an increase in $CD4^+$ T lymphocytes, a decrease in $CD8^+$ T cells and NK cells, and a biphasic pattern in Th17 cells. At the molecular level, an immune polarization characterized by high expression of RORγt and FoxP3, along with persistent TNFB and IFNG expression and variations in IL-1B and IL-8, was observed. Additionally, anti-inflammatory genes such as ARG1 and HMOX1 were overexpressed in early stages, suggesting compensatory mechanisms.
Treatment with a synthetic compound based on marine-derived structures (M9) reduced the expression of proinflammatory mediators and induced an anti-inflammatory response. Overall, the findings indicate that DM1 progresses through a dynamic balance between inflammatory and regulatory responses, and that novel bioactive molecules may hold immunomodulatory therapeutic potential.

In the second study, 74 DM1 patients were evaluated and classified according to disease duration (A: <3 months; B: 3 months–1 year; C: 1–5 years; D: >5 years), along with 23 healthy controls. Serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, biochemical parameters, and retinal characteristics assessed by optical coherence tomography (OCT) were analyzed.
The results showed an increase in proinflammatory cytokines (IL-1β, TNF-α, IL-18, IL-12Ra, IL-8, MCP-1, MIF, IP-10, M-CSF) in early stages (group A) and a combination of proinflammatory (Eotaxin, IL-8, IL-2Ra, MCP-1, MIG, IL-12(p70), IL-17) and anti-inflammatory cytokines (IL-4, LIF) in intermediate stages (group C). Moreover, correlations were observed between proinflammatory cytokine levels and early signs of diabetic retinopathy, such as retinal thinning, increased foveal avascular zone area, and neovascularization in groups C and D.
Overall, the cytokine profiles identified reflect a dynamic immunological evolution during DM1 and may serve as useful immune biomarkers to improve diagnosis, prognosis, and clinical management of the disease and its ocular complications.

In the third study, mechanisms associated with disease progression were investigated by analyzing patients classified into two groups according to disease duration: Early (<1 year) and Advanced (>1 year), along with a healthy control group (H). Proteomic analysis of PBMCs and serum quantification of inflammatory mediators identified differentially expressed proteins involved in vesicular transport, immune responses, and metabolism. Several proteins associated with IL-12 signaling in macrophages (APOA2, APOC1, APOC3, PON1, AAK1, and CBL) were downregulated. Serum IL-12 levels were significantly higher in the Early-stage group compared with controls ($p<0.001$), while in the Advanced group only an upward trend was observed.

CBL was proposed as a marker of immune status during DM1 progression, and HRG as a potential biomarker of secondary complications such as diabetic retinopathy. Taken together, these results provide key insights into the immunometabolic mechanisms underlying the disease and may guide novel diagnostic and therapeutic strategies.
In summary, the findings of this work demonstrate that the progression of type 1 diabetes mellitus is marked by a dynamic interplay between inflammatory and regulatory mechanisms of the immune system. The specific cytokine and protein profiles identified not only reflect the immunological state across different disease stages but also emerge as potential biomarkers to improve diagnosis, prognosis, and the prevention of secondary complications such as diabetic retinopathy.

Furthermore, the positive response observed to bioactive compounds with immunomodulatory properties suggests promising therapeutic potential aimed at modulating inflammation, optimizing clinical management, and promoting better long-term outcomes in patients with DM1.

2. Introducción

2.1 Definición de la Diabetes Mellitus

La organización mundial de la salud define a la diabetes mellitus como una enfermedad crónica que sucede cuando el páncreas es incapaz de generar suficiente insulina o porque el propio cuerpo es incapaz de utilizar efectivamente la insulina generada. (https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes). El déficit de insulina genera un aumento en los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), siendo este factor determinante en ocasionar severos daños a diferentes órganos y sistemas (Banday et al., 2020), fundamentalmente, retina, sistema nervioso y riñones. La diabetes mellitus presenta características fenotípicas, etiológicas o patogénicas propias, pero en algunos casos estos presentan fenotipos similares entre los distintos tipos. Principalmente se pueden identificar la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y la tipo LADA (del inglés *Latent Autoimmune Diabetes of the Adult*), siendo ambas de origen autoinmune, así como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la diabetes mellitus gestacional, presentando ambas resistencias a la insulina (Genuth et al., 2021; Kumara Venkatesan & Review, 2021).

La DM1, representa, aproximadamente, un 5% de todos los casos de diabetes, y ocurre debido a procesos inflamatorios autoinmunes en los que participan linfocitos T y células B que actúan y destruyen, selectivamente, las células β-pancreáticas productoras de insulina (Katsarou et al., 2017). Esto provoca con el tiempo la pérdida total de esta población celular y, por consiguiente, la perdida de producción de insulina. Generalmente, se utilizan marcadores autoinmunes para el diagnóstico de DM1, ya que estos pacientes presentan autoanticuerpos frente a las células β como los dirigidos contra potenciales autoantígenos como GAD, IA-2, insulina y transportador de Zn (Jun et al., 2002).

La patogenia de la DM1 no sólo viene definida por la presencia de autoanticuerpos, sino porque también se han identificado alteraciones genéticas. Entre ellas, se han descrito modificaciones en genes relacionados con el MHC de clase II (del inglés *Major Histocompatibility Complex*) y los genes relacionados con la insulina (Paschou et al., 2018; Pociot & McDermott, 2002). Se trata de una patología con un alto componente hereditario, pero puede aparecer de "*novo*" (Zorena et al., 2022). Clínicamente los síntomas de la DM1 son: pérdida de peso, poliuria, polidipsia y en los casos más graves aparece la cetoacidosis diabética (DiMeglio et al., 2018). La DM1 suele ser diagnosticada

en etapas tempranas la vida, normalmente en la etapa prepuberal, aunque no es sólo un evento pediátrico, ya que también puede ser identifica en etapas posteriores (Banday et al., 2020; Ilonen et al., 2019). Se trata de una enfermedad incurable y los pacientes deben controlarse la glucemia mediante administración de insulina exógena y muestran una mayor predisposición a desarrollar otras enfermedades autoinmunes (Genuth et al., 2021).

2.2 Factores genéticos

Como se ha expuesto anteriormente, el desarrollo de DM1 presenta causas de origen genético (Waernbaum & Dahlquist, 2016; Zorena et al., 2022). Los individuos con antecedentes familiares de DM1, presentan un incremento del 6% en la probabilidad de desarrollar la enfermedad, comparado con el 0,4% que se da en la población general (Pociot & McDermott, 2002) y su prevalencia depende del grupo étnico al que se pertenece (Zorena et al., 2022). Uno de los principales factores que promueven la aparición de DM1, son las características genéticas que generan un potencial de autorreactividad aberrante para los autoantígenos de los islotes pancreáticos. En este sentido, las alteraciones genéticas están íntimamente relacionadas con el componente inmunitario responsable de la reacción exacerbada y deletérea (Concannon et al., 2009), como HLA (del inglés *Human Leukocyte Antigen*). El HLA, siglas del MHC en humanos, se localizan en el cromosoma 6, concretamente en el locus IDDM1 (del inglés *Insulin Dependent Diabetes Mellitus-type 1*). Este locus se divide en tres regiones denominadas clase I, II y III (**Figura 1**). Las modificaciones en el HLA de clase I, favorecen la respuesta de los linfocitos T $CD8^+$ a autoantígenos, ya sea por modificaciones en genes que codifican para las subunidades del HLA clase I o porque existen genes afectados, implicados en el procesado antigénico como por ejemplo el gen *TAP* que es participante en el procesado antigénico y la transferencia de estos al HLA clase I (Medhasi & Chantratita, 2022). Las regiones II y III, contienen genes de implicados en procesos inmunes como por ejemplo los genes del TNF (del inglés *Tumor Necrosis Factor*). Concretamente las modificaciones en el HLA de clase II afectan al reconocimiento de autoantígenos y no influyen en la progresión de la enfermedad una vez que se ha desarrollado autoinmunidad frente a autoantígenos (Ilonen et al., 2019; Herold et al., 2024).

En la estela del interés de los factores genéticos involucrados en el desarrollo de DM1, está descrito que el gen de la insulina (INS), localizado en el cromosoma 11, en el locus

IDDM2 (Katsarou et al., 2017; Pociot & McDermott, 2002; Taplin & Barker, 2008), que codifica para la producción de insulina, pudiendo la insulina actuar como un autoantígeno en la respuesta inmune, con afectación de las células β (Ilonen et al., 2019; Pociot & McDermott, 2002). La asociación genética del INS con la DM1 es atribuible a la variación alélica en la región promotora del INS, que se corresponde con la expresión diferencial de proinsulina en el timo (Pugliese et al. 1997). Este fenómeno se correlaciona con una menor frecuencia de expresión del gen tímico de insulina, favoreciendo de esta forma la presencia de un mayor potencial autorreactivo (Durinovic-Belló et al., 2010), presumiblemente, debido a una selección negativa ineficiente durante la maduración de las células T.

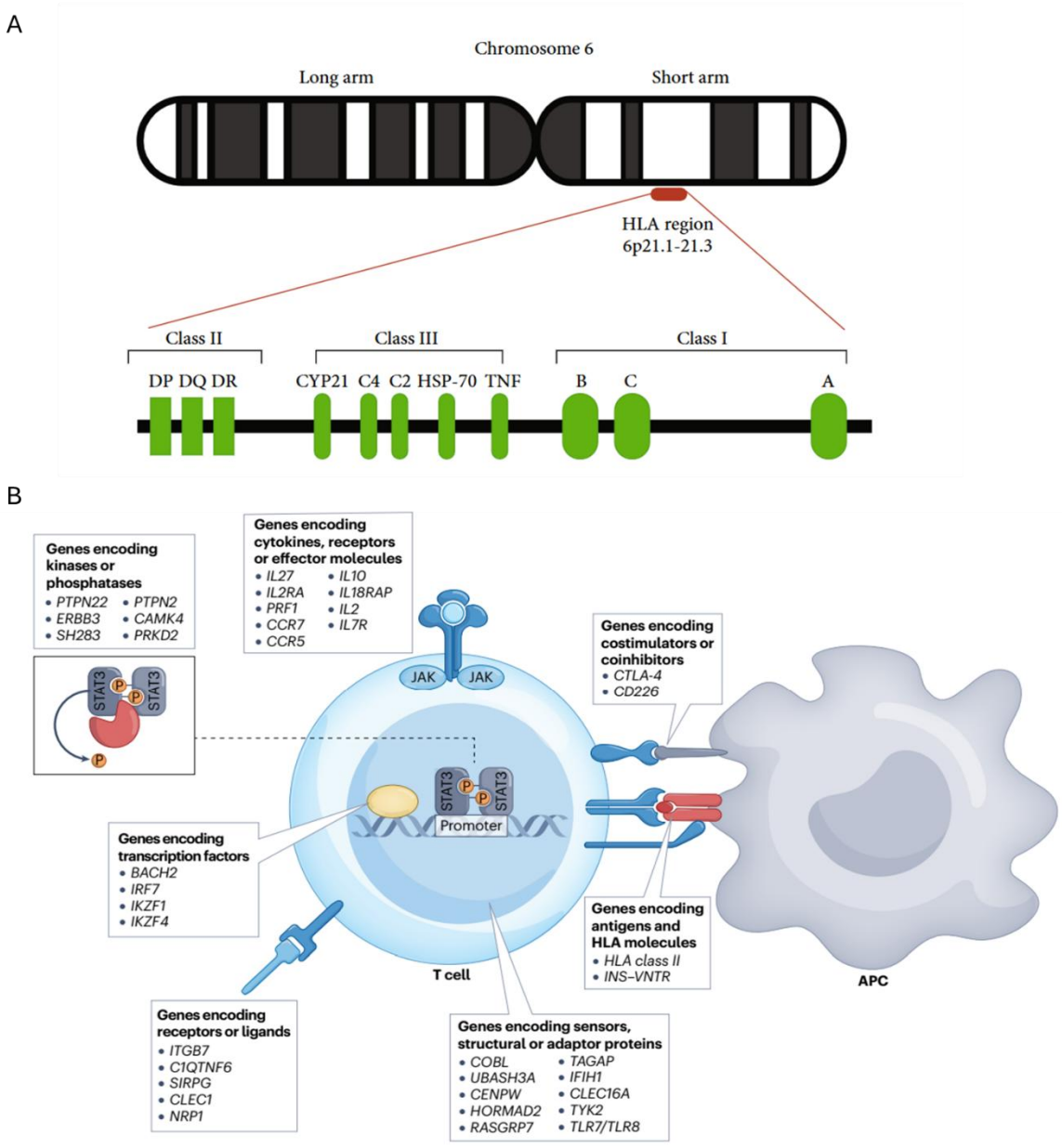


Figura 1: Gen del HLA y otros genes implicados en el desarrollo de la DM1. A es la representación esquemática del locus del HLA en el cromosoma 6. **B** presenta varios otros genes cuya alteración condiciona la respuesta de las células T. Ciertos haplotipos del HLA de clase II junto con otros genes se han relacionado con un aumento en la respuesta inmune frente a los islotes pancreáticos al estar estas involucradas en la función, activación y diferenciación de los linfocitos T. Imagen modificada de Medhasi & Chantratita, 2022 y Herold et al, 2024.

Existen otras mutaciones que también favorecen el desarrollo de la DM1, como las que generan la pérdida de la función de *FOXP3*, proteína esencial para el correcto funcionamiento de las células T reguladoras (Treg) y cuya disfunción puede ocasionar el síndrome de autoinmunidad multiorgánico que se manifiesta a temprana edad y provoca enteropatía autoinmune, DM1 y eccemas. Por otro lado, los polimorfismos en la *PTPN22* y en la proteína LYP (del inglés *Lymphoid Phosphatase*), modifican la función y respuesta de varias células inmunes: T, B y Treg. (Noble & Erlich, 2012; Paschou et al., 2018).

Ninguno de los rasgos genéticos descubiertos hasta la fecha, presentan una penetrancia total para el desarrollo de la DM1; dado que, en individuos sin diabetes se detectan modificaciones en estos genes, y poblaciones de células T $CD4^+$ autorreactivas, lo cual nos indica que, si bien estos genes predisponen al desarrollo de la enfermedad, por sí solos no son suficientes. En este sentido, los genes de susceptibilidad son mecánicamente responsables de crear un entorno que favorece potencialmente los eventos de activación inmunitaria a través de desencadenantes ambientales que permiten la progresión de la enfermedad.

Por todo ello, el desarrollo de la DM1 a nivel genético es el resultado de diferentes combinaciones de polimorfismos que promueven el desarrollo de la autoinmunidad frente a las células β. Las células T autorreactivas con especificidad del islote pancreático se encuentra en todos los individuos genéticamente susceptibles, siendo de gran importancia determinar aquellas características que causan la pérdida de tolerancia, ocasionando de esta forma el desarrollo y progresión de la enfermedad en algunos, pero no en todos, los individuos.

2.3 Sistema inmune

El sistema inmune lo conforman un conjunto de células, mediadores químicos y enzimas cuya función es la defensa del organismo frente invasiones/infecciones causadas por hongos, bacterias y parásitos, encargando de la destrucción de estos ya que son capaces de discernir entre lo que pertenece al organismo y lo que no. El sistema inmune puede ser dividido en dos tipos; sistema inmune innato y adaptativo (Eter et al., 2000).

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra patógenos y están presentes desde siempre y no son muy específicos, lo conforman las barreras anatómicas (epitelio, piel, membranas mucosas) que previenen la entrada de patógenos, y además poseen receptores de reconocimiento de patógenos, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, lo que ocasiona la activación de una respuesta inflamatoria celular (Mokhtar et al., 2023; Mogensen, 2009). En el componente celular se incluyen las células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos), células fagocíticas (monocitos, macrófagos y células dendríticas) y las células natural killer (NK), estas reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos haciendo que estos sean fagocitados, ocasionarles lisis, provocar apoptosis o que se presenten los antígenos por parte de células presentadoras de antígeno a componentes del sistema inmune adaptativo, mostrando como ambos sistemas están entrelazados (Lackey & Olefsky , 2016; Iwasaki & Medzhitov, 2015). Las células frente a un patógeno liberan mediadores inflamatorios los cuales están implicadas directamente en la respuesta frente a los patógenos y controla la actividad de las células involucradas (Hato & Dagher, 2015).

El sistema inmune adaptativo es capaz de actuar frente a objetivos específicos y lo componen los linfocitos T y B (Hillion et al., 2020). Las células presentadoras de antígenos, está compuesto por células dendríticas, linfocitos B y macrófagos. Son células especializadas que tienen la capacidad de reconocer patógenos, fagocitarlos y procesarlos para generar antígenos y ¨presentarselo¨ por el MHC de clase II a los linfocitos T $CD4^+$ para que estos se activen. Las células presentadoras de antígenos van hacia los nódulos linfáticos donde gracias al MHC clase II estos antígenos son reconocidos por los receptores de los linfocitos T, ocasionando un proceso de clonaje, expansión y diferenciación (Th1, Th2 y Th17) de estas células que son capaces de atacar al patógeno del cual procede ese antígeno y una vez eliminado el patógeno, una parte de estas células permanecen en forma de células de memoria que permite una rápida respuesta a infecciones recurrentes del

mismo patógeno (Rodríguez-Pinto, 2005; Rossjohn et al., 2015). Presenta dos tipos de respuesta posible denominadas inmunidad humoral e inmunidad celular.

La inmunidad humoral esta mediada por los linfocitos B, en la cual una vez estos han sido activados por la unión de un antígeno al receptor de las células B o BCR o por activación mediante la interacción con linfocitos T $CD4^+$ activados. Una vez los linfocitos B se activan, se diferencian en células plasmáticas o células B de memoria (Nutt et al., 2015). Las células plasmáticas sintetizan y secretan anticuerpos específicos contra el patógeno, los anticuerpos son proteínas formadas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras que presentan una región de unión a anticuerpos o región variable y una región invariable (Amanna & Slifka, 2010). Las células B memoria permanecen inactivas hasta que se da una exposición a antígenos secundaria, haciendo una respuesta más rápida (Sebina & Pepper, 2018).

La inmunidad celular está dirigida principalmente por los linfocitos T, estas células migran al timo donde maduran y desarrollan su receptor o TCR que son capaces de discriminar entre los péptidos propios y lo que no lo son, reconociendo el HLA y es en el timo donde los linfocitos T autorreactivos son eliminados (Hogquist et al., 2015; Kumar et al., 2018). Los linfocitos T se dividen en tres tipos según su función: Linfocitos T helper o Th, linfocitos T citotóxicos y linfocitos T reguladores. Los Th expresan CD4 en su superficie y su función es la de ayudar a tanto la inmunidad humoral como el celular se lleven a cabo y según el tipo de respuesta que estos den, se dividen en Th1, Th2 y Th17 (Saravia et al., 2019). Los linfocitos T citotóxicos expresan CD8 en su superficie y se encargan de la destrucción de células con patógenos intracelulares y células tumorales mediante apoptosis (Kech & Wherry, 2007). Los linfocitos Treg se encargan de regular tanto la respuesta inmune, suprimiendo la acción tanto de los Th como los T citotóxicos, siendo esenciales en el mantenimiento de la tolerancia a autoantígenos previniendo la autoinmunidad (Sakaguchi et al., 2020).

Cuando la homeostasis del sistema inmune se ve alterada, puede ocasionar el desarrollo de enfermedades como inmunodeficiencias (falta de algún elemento) o inmunopatías como enfermedades autoinmunes (Azizi et al., 2016), que provocan que el sistema inmune se active por el reconocimiento de elementos del propio individuo, ocasionando que este ataque dichos elementos provocando daños en el organismo (Lupus eritematoso, DM1,

artritis reumatoide, esclerosis múltiple…) (Rosenblum et al., 2015).

Los mecanismos autoinmunes implicados en la patogénesis de la DM1 comprenden diversos subconjuntos de células inmunitarias, incluidas los linfocitos T $CD4^+$ (naïve y efectoras Th1, Th2, Th17, células T foliculares colaboradoras [Tfh] y células T reguladoras $CD4^+$ [Treg]) (Chen et al., 2024; Damond et al., 2019) las células T $CD8^+$ (células T $CD8^+$ con características de células madre, células T $CD8^+$ activadas o afectadas, células T de memoria efectora, memoria central, células T $CD8^+$ exhaustas y células T $CD8^+$ reguladoras [Treg]) (Abdelsamed et al., 2020; Yang et al., 2024); así como poblaciones de células B (células B $CD20^+$, células B reguladoras [Breg], entre otras) (Mariño et al., 2012). Otros subconjuntos de células inmunitarias, incluidas las células asesinas naturales (NK) (Aboelnazar et al., 2021) y los monocitos (Pant et al., 2024), también contribuyen a la patogénesis de la DM1. Dada la diversidad de poblaciones celulares inmunitarias implicadas en la DM1, los estudios recientes se han centrado principalmente en dilucidar sus firmas celulares distintivas, las vías de señalización (Xie et al., 2025) y las interacciones intercelulares que participan colectivamente en el proceso patológico (Sona et al., 2022). Esta línea de investigación resulta particularmente relevante en la búsqueda continua de estrategias terapéuticas eficaces y biomarcadores de diagnóstico temprano para la DM1.

2.3.1 *Pérdida de la tolerancia antigénica*

La pérdida de tolerancia en DM1 indica defectos en la regulación inmunitaria o una activación defectuosa. Los estudios de biomarcadores, fenotípicos y funcionales indican que ambos motivos están estrechamente vinculados a la progresión de la enfermedad. De hecho, los datos obtenidos a partir de ensayos clínicos y estudios observacionales indican que las intervenciones terapéuticas que abordan solo uno, pero no el otro, son insuficientes para restaurar la tolerancia (Huffaker et al., 2021; Nepom, 2022). Una de las características notables de los ensayos clínicos inmunomoduladores en DM1 es que, múltiples estrategias terapéuticas han mostrado una modulación transitoria, que ha permitido evitar la progresión de la DM1 (Cobo-Vuilleumier et al., 2023).

Dado que esta fase del desarrollo de la autoinmunidad se caracteriza por la propagación de los determinantes del antígeno, también es un momento en el que terapéuticamente se puede interferir en la colaboración intercelular, como las interacciones de células T con

células B y/o con células dendríticas. Estudios inmunológicos recientes en DM1, identifican células B autorreactivas anérgicas periféricas, que son potencialmente tolerantes, aunque esto parece ser reversible sólo en un subconjunto de células B con estas características, que contribuyen directamente a la patogénesis (Stensland et al., 2023).

La pérdida de tolerancia por parte de las células T está caracterizada por la adquisición de marcadores que indican activación *in vivo* (Yang et al., 2017; Beeton et al., 2006), ausencia o déficit en las células T reguladoras (Treg) funcionales (Hull et al., 2017; Long et al., 2010), así como la incapacidad de las células T efectoras para responder a la regulación (Schneider et al., 2008), y por las expansiones en subconjuntos potencialmente inflamatorios (Arif et al., 2017) (**Figura 2**).

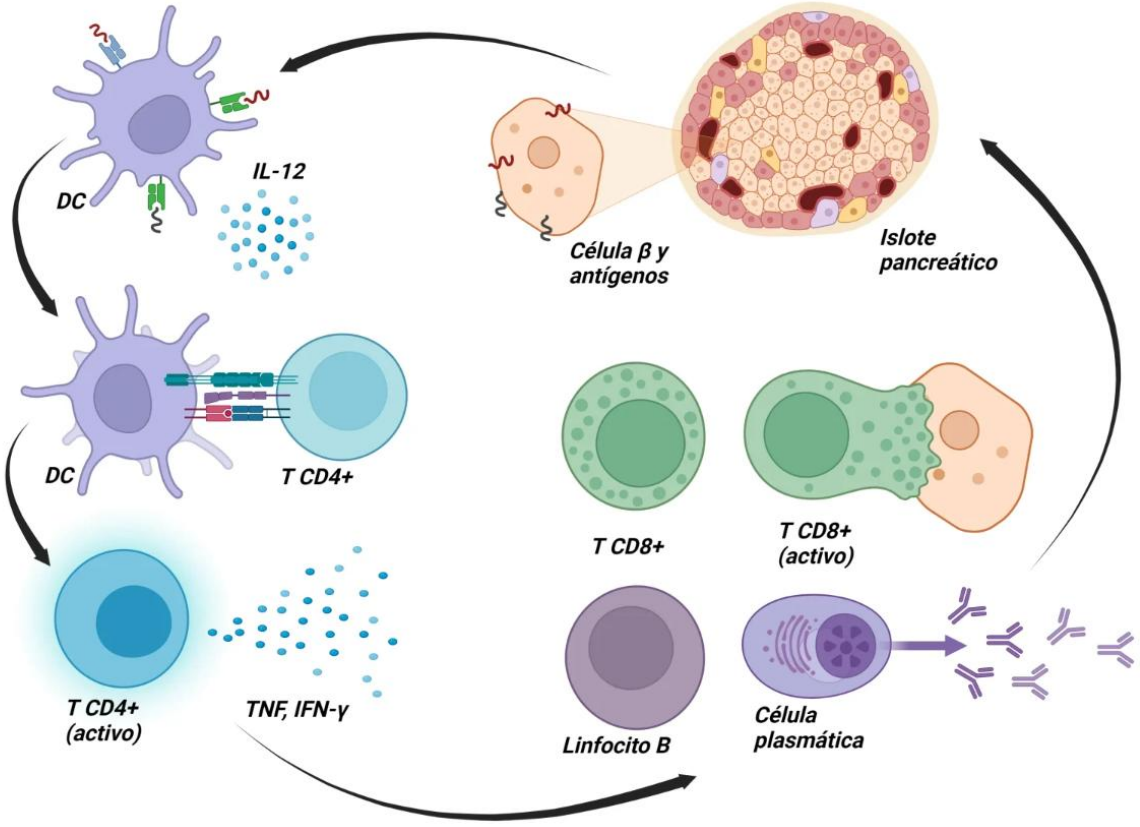


Figura 2: Pérdida de la tolerancia antigénica. Las células β de los islotes pancreáticos presentan una serie de antígenos que son recogidos por las células presentadoras de antígeno y presentadas a los linfocitos T $CD4^+$ mediante el HLA clase II, estos se activan iniciando la respuesta inmune frente las células β. Imagen en https://revistadigital.univim.edu.mx/diabetes-mellitus-tipo-1-el-rol-inmune-y-sus-repercusiones/.

Cada una de estas características de las células T pueden ser interpretadas como biomarcadores potencialmente útiles para poder llevar a cabo con mayor efectividad un seguimiento del estado de la enfermedad. Sin embargo, en otros casos, es la pérdida de un fenotipo de células T, como el agotamiento de las células T, lo que indica una respuesta del efector, asociada con una progresión aún más rápida de la enfermedad (Wiedeman et al., 2020).

Existen evidencias de que los autoanticuerpos tienen un papel fundamental en el inicio y la progresión de la DM1, ya que promueven una respuesta más agresiva por parte de los linfocitos T y además afectan a la forma en la que las células presentadoras de antígenos procesan y presentan los antígenos, provocando que estos presenten a las células T varios epítopos del mismo antígeno, provocando una respuesta inmune más amplia (Howson et al., 2011; Pihoker et al., 2005; Scherm et al., 2022). En el caso de la DM1, la modulación de la presentación de autoanticuerpos tipo anti-ácido glutámico descarboxilasa (GAD), inician la degradación de la tolerancia inmunológica a las células β del páncreas y altera así el enfoque de la respuesta de las células T (Fuchs et al., 2017; Pugilese et al., 1997; Standifer et al., 2006; Yeo et al., 2020). Debido a la pérdida de tolerancia y la consecuente respuesta inmune, se producen daños en los islotes pancreáticos, que promueven la activación de respuestas de estrés por parte de las células β que exacerba aún más la respuesta inmune que se está llevando a cabo, fomentando así la destrucción de estas células. El daño de las células de los islotes pancreáticos va acompañado de una respuesta de estrés de las células β que amplifica aún más la actividad inmune. Por tanto, la modulación de la tolerancia inhibe la respuesta de las células T a autoantígenos específicos, contribuyendo de esta forma a ralentizar y/o controlar el progreso de la enfermedad.

2.3.2 *Autoanticuerpos*

La producción de autoanticuerpos por pérdida de tolerancia antigénica es una de las principales características de la DM1, desarrollando una respuesta autoinmune frente a autoanticuerpos anti-islotes. Estos autoanticuerpos conforman un grupo denominado ICA (del inglés *Islet-Cell Autoantibodies*) constituido por: GAD, IAA (del inglés *Insulin Autoantibodies*), IA-2A (del inglés *Protein-tyrosine Phosphatase Autoantibodies*) y ZnT8A (de inglés *Zinc Transporter-8 Autoantibodies*) (Lampasona & Liberati, 2016).

Estos autoanticuerpos desempeñan un papel fundamental en la autoinmunidad frente a las células β. Los anti-GAD atacan a la enzima encargada de producir el principal neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso central (Jun et al., 2002; Taplin & Barker, 2008), aunque este autoanticuerpo puede encontrarse en otras enfermedades autoinmunes como diabetes tipo LADA, ataxia cerebelar, etc (Lampasona & Liberati, 2016). Los IAA engloban a todos los anticuerpos que actúan contra la preinsulina e insulina, específicos de las células β. Los IAA suelen estar presentes desde momentos iniciales del desarrollo de la DM1 y su diagnóstico clínico (Lampasona & Liberati, 2016; Taplin & Barker, 2008). IA-2A son los autoanticuerpos contra una proteína transmembrana presente en los gránulos de secreción de las células β y de células neuroendocrinas que también estimulando la exocitosis de los gránulos de insulina (M. Acevedo-Calado et al., 2017; M. J. Acevedo- Calado et al., 2019). ZnT8A es un autoanticuerpo frente a una proteína cuya principal función es el transporte de zinc al interior de los gránulos para mantener su homeostasis (Chimienti et al., 2005).

Se ha descrito una detección secuencial de los distintos autoanticuerpos asociados a la DM1, con posible función diferencial sobre la respuesta inmune. Inicialmente se detectan GADA e IAA, mientras que IA-2A y ZnT8A aparecen en etapas más tardías (Katsarou et al., 2017).

Individuos que presenten resultados positivos para varios de estos autoanticuerpos, supone que presentan una predisposición a desarrollar DM1 con una probabilidad del 75% o superior. Mientras que, un resultado positivo en uno solo de estos representa tan solo un 25% de probabilidades de desarrollarla (Kahaly & Hansen, 2016).

2.3.3 *Contribución del sistema inmune a los procesos apoptóticos en células β*

En la DM1, el sistema inmunitario innato y adaptativo desempeña un papel crítico en la destrucción de las células β. La formación inadecuada de las células T en el timo, provoca un defectuoso proceso de selección de estos, ocasionando de esta forma la presencia en el organismo de células T autorreactivas que son capaces de reconocer los antígenos asociados a las células β y desencadenar una respuesta autoinmune (Burrack et al., 2017). Durante la DM1 se produce, por tanto, un fenómeno inflamatorio denominado insulitis caracterizado por infiltración de células inmunitarias en los islotes de células pancreáticas

o de Langerhans que está acompañado de la inducción de secreción de mediadores inflamatorios.

La insulitis afecta principalmente a las células β productoras de insulina con cambios histológicos específicos en los islotes (Campbell-Thompson et al., 2013). Este fenómeno involucra a varias células inmunes, incluyendo las células T, las células B, los macrófagos, las Th y las células NK.

El proceso de activación de la respuesta inmunitaria en el páncreas está orquestado por los distintos tipos celulares inmunes, con participación específica y contribución particular en cada fase del proceso. Así pues, los linfocitos B contribuyen mediante la síntesis de autoanticuerpos y la regulación de la activación, proliferación y producción de citoquinas por parte de las células T $CD4^+$ autorreactivas (Burrack et al., 2017). La inflamación cursa con una mayor infiltración de células T $CD8^+$ y muerte directa de células beta por perforina y granzima B, mientras que los linfocitos Treg tratan de regular esta reacción liberando TGFβ e IL-10 aunque muchas veces sin éxito (Burrack et al., 2017). La participación de las células dendríticas y macrófagos se centra en la presentación el antígeno a los linfocitos T $CD4^+$, además de secretar diversos factores de crecimiento y citoquinas (TNF-α, IL-1β, IL-12…); así mismo, favorecen el mantenimiento de la tolerancia mediante la activación de linfocitos Treg (Morel, 2013). La producción de citoquinas sumado a su capacidad presentadora de antígenos, hacen que las células T se activen y se diferencien a uno de los diversos tipos de linfocito T helper (Th1, Th2, Th17) (Akkaya et al., 2020).

Las células NK, mediante la secreción de citoquinas como IFN-γ, contribuyen directa e indirectamente a la destrucción de las células β. Existe un incremento en el número de células NK pancreáticas citotóxicas y con perfil expansivo en el tejido, que contribuye a la destrucción de las células β pancreáticas y a la patogénesis de la DM1 (Gur et al., 2010).

La infiltración de los neutrófilos activos en el páncreas media la aparición y progresión de la DM1 mediante la secreción de mediadores inflamatorios como IFN-γ o IL-1β, que presentan una respuesta amplificadora, por lo que la inhibición de la secreción de estos mediadores ha demostrado la capacidad de amortiguar el desarrollo de la DM1 (Citro et al., 2015; Ha et al., 2017).

Durante el desarrollo de la DM1, los macrófagos están presentes de forma constante, siendo predominantes en los islotes dañados y sin expresión de insulina (Burrack et al., 2017). Los macrófagos participan mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias, como TNF-α e IL-1β, así como las quimioquinas CXCL9 y CXCL10, fundamentalmente. La liberación de estos mediadores inflamatorios actúa como inmuno-atrayente de células dendríticas, macrófagos y linfocitos T, hacia los islotes (Kawakami et al., 2005; Lieberman et al., 2003).

Un rasgo diferencial de los macrófagos como células inmunes es la capacidad que presentan de responder ante distintos estímulos ambientales, modificando su fenotipo en función de la respuesta inducida en ellos. En función del tipo de respuesta, los macrófagos pueden catalogarse en M1 o proinflamatorio y M2 o antiinflamatorio (Yunna et al., 2020). Los macrófagos denominados, M1 surgen en respuesta a un contexto inflamatorio mediado por los Toll-like receptors (TLRs) e IFN-γ, estos normalmente están asociado a la inmunidad frente a patógenos o bacterias en la que participan los linfocitos Th1. Los macrófagos M1 liberan varios tipos de citoquinas proinflamatorias como IL-1β, TNF-α o IFN-γ, además de mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) generar y liberar óxido nítrico (NO) que presenta actividad antimicrobiana y proinflamatoria. Los macrófagos M1 también son capaces de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido O_2^- y el peróxido de hidrógeno H_2O_2 que causa a los patógenos daños oxidativos directos en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y activar la vía de NF-κB, pero en exceso puede causar severos daños a los tejidos colindantes. (Italiani & Boraschi, 2014; Murray, 2017).

La activación M2 o alternativa se da en ambientes con una predominancia de la respuesta de linfocitos Th2 que responden a parásitos o reacciones de alergia por liberación de IL-4 e IL-13. Los macrófagos M2 tienen una función de reparación tisular al secretar factores promotores del crecimiento y regeneración del tejido dañado como VEGF (del ingles *Vascular Endotelial Growth Factor*) y producir mediadores antiinflamatiorias como IL-10, TGF-β o Arginasa-1 (Murray, 2017). Existen 4 subtipos de macrófagos M2, denominados M2a, M2b, M2c y M2d. Macrófagos M2a son aquellos que se activan en respuesta a IL-4 o IL-13 y su función principal es la fagocitosis y la activación de los

Treg. Los macrófagos M2b se activan en respuesta a IL- 1β o inmunocomplejos (resultado de la unión antígeno-anticuerpo) y pueden actuar como pro o antiinflamatorios al liberar citoquinas como TNF-α o IL-10 (Roszer, 2015; L. Xun Wang et al., 2019). Los macrófagos M2c se activan en respuesta a IL-10 y TGF-β, que a su vez son producidos por ellos mismos, y son los que tienen la mayor capacidad antiinflamatoria debido a su gran actividad fagocitadora de células apoptóticas. Los macrófagos M2d que derivan de macrófagos M1 en respuesta a elevados niveles de adenosina en el medio extracelular ocasionado por las células apoptóticas y necróticas y liberan factores antiinflamatorios y de regeneración tisular (**Figura 3**). Hay que recalcar que, la activación de un macrófago M2 en cualquiera de sus subtipos no impide que este pueda cambiar de subtipo e incluso a M1 o viceversa, todo depende del microambiente en el que se encuentren (Sezginer & Unver, 2024).

Las citoquinas del entorno, así como las secretadas propiamente por el macrófago, crean un bucle de retroalimentación positiva, convirtiendo los macrófagos en fenotipo proinflamatorio (M1), aumentando la producción de citoquinas que promueve que se recluten más células inmunes y que se liberen aún más citoquinas lo aumentando la muerte de las células (Calderon et al., 2008). Varios estudios han demostrado que una activación de los macrófagos en fenotipo M2 previo a la insulitis, no solo ayuda a la protección del islote pancreático, sino que además es capaz de promover la regeneración y proliferación de las células β, pudiendo incluso ralentizar el desarrollo de la DM1 (Ajendra et al., 2016; Jackson-Thompson et al., 2020; Saunders et al., 2007; Zhang et al., 2024).

Por todo lo anteriormente mencionado, las citoquinas se sitúan como elementos principales desencadenantes del estrés y muerte celular por apoptosis de las células β.

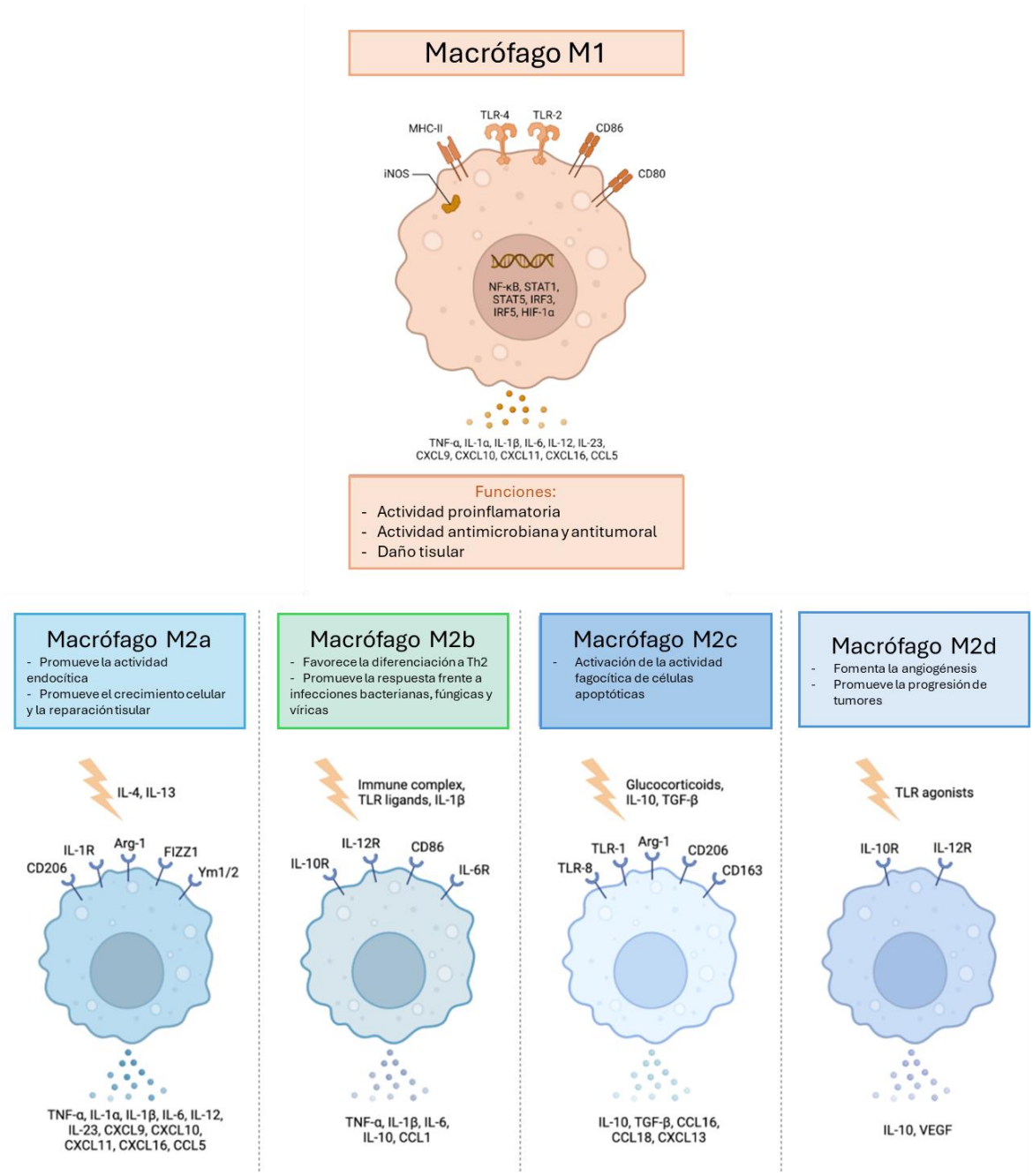


Figura 3: Tipos de macrófagos. Los macrófagos pueden diferenciarse en dos subtipos denominados M1 y M2 siendo M1 macrófagos con actividad proinflamatoria, y M2 con actividad antiinflamatoria. Dentro de los M2 podemos encontrar hasta 4 subtipos diferentes siendo estos denominados desde la a hasta la d, teniendo la mayoría de estos un tipo de respuesta antiinflamatoria con la excepción de los M2b que también pueden presentar actividad proinflamatoria. Imagen modificada de Yao et al., 2019.

2.3.4 *Participación de las citoquinas en la respuesta inmunitaria contra las células β durante la DM1.*

Las redes de citoquinas involucradas en el desarrollo y progresión de la DM1 orquestan la respuesta inflamatoria que movilizan el sistema inmunitario hasta el órgano diana. En individuos con una predisposición para la tolerancia central fallida, las células inmunes autorreactivas se activan. Esto lleva a una inflamación crónica prolongada y un ataque autoinmune, característico de la DM1 (Campbell-Thompson et al., 2013).
Las citoquinas clásicas como IL-1β, IL-6, TNF-α e IFNs entre otros son las causantes de los procesos inflamatorios en la DM1 (Rojas et al., 2018; Lu et al., 2020).

La IL-1β es una citoquina proinflamatoria crucial en la mediación de la respuesta inmune y la inflamación. IL-1β causa disfunción y muerte de las células β (Netea et al., 2017) debido a una mayor expresión de los receptores de IL-1β (Böni-Schnetzler et al., 2009). activando diversas cascadas de señalización intracelular, como la vía mediada por el factor nuclear kappa B (NF-κB) y las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), que regulan procesos apoptóticos en las células β (Wang et al., 2023) e inicia la transcripción de genes proinflamatorios, incluyendo IL-6, TNF-α, así como, distintos componentes del complejo del inflamasoma (Blevins et al., 2022; Oliver et al., 2009) (**Figura 4**).

En la insulitis, se produce sobreexpresión de IL-6 en las células pancreáticas que confluye con una mayor infiltración inmune de células B, macrófagos y células T (Lu et al., 2020). Se ha demostrado que la elevada expresión del receptor de IL-6 (IL-6R) en células T $CD4^+$ y $CD8^+$ de pacientes con DM1 depende de la activación de vía de señalización mediada por STAT3 (Hundhausen et al., 2016).

La familia IFN (IFN-α e IFN-γ), está vinculada a las distintas etapas de la muerte de la célula β durante la DM1. IFN-α induce la muerte de las células β mediante potenciación del estrés del retículo endoplasmático, promoviendo la sobreexpresión de las moléculas HLA-I y además puede promover la activación de la ruta apoptótica mediada por caspasa-8 (Lombardi & Tomer, 2017; Marroqui et al., 2017; Tomita, 2017) y al igual que la IL-6, es capaz de inducir la activación de la vía de señalización STAT en células inmunes,

fomentando la activación y producción de mediadores inflamatorios (Tsai et al., 2019). IFN-γ activa las células pancreáticas locales para expresar MHC-I y MHC-II de forma anormal, lo que favorece la muerte de las células β (Campbell et al., 1985; Sarvetnick et al., 1988).

Inicialmente algunas de las citoquinas implicadas presentan un papel destructor de las células β, como IFN-γ y TNF-α. Sin embargo, en otras situaciones puede facilitar la resolución de la respuesta inmune conduciendo la expresión de PD-L1 (del inglés *Programmed Death-Ligand 1*) y cuya función es la de inhibir la proliferación de las células T y suprimir la apoptosis en las Treg de los tejidos diana, funcionando de esta forma como un supresor de la respuesta inmunitaria (Castro et al., 2018; Osum et al., 2018).

IL-15 puede acelerar el progreso de la DM1, pero también puede tener efectos diabetogénicos a través de la activación de Treg contrarrestando los efectos nocivos de la diabetes. Por otro lado, las citoquinas Th17 (IL-17, IL-22 e IL-25), la familia IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35), y otras citoquinas, como IL-33, IL-7e IL-21 también desempeñan un papel fundamental en los procesos iniciales de la DM1 y en la destrucción de las células β (Lu et al., 2020).

Tomadas en conjunto, las redes de citoquinas desempeñan papeles cruciales en la orquestación de la inflamación durante las fases de iniciación y destrucción de la masa beta en pacientes con DM1, así como en la resolución de la respuesta inmune subsiguiente, limitando así la destrucción progresiva. La plasticidad de las células inmunes podría influir en la actividad de las citoquinas, lo que podría conducir a los efectos patogénicos o reguladores de las citoquinas en los diversos microentornos durante la DM1.

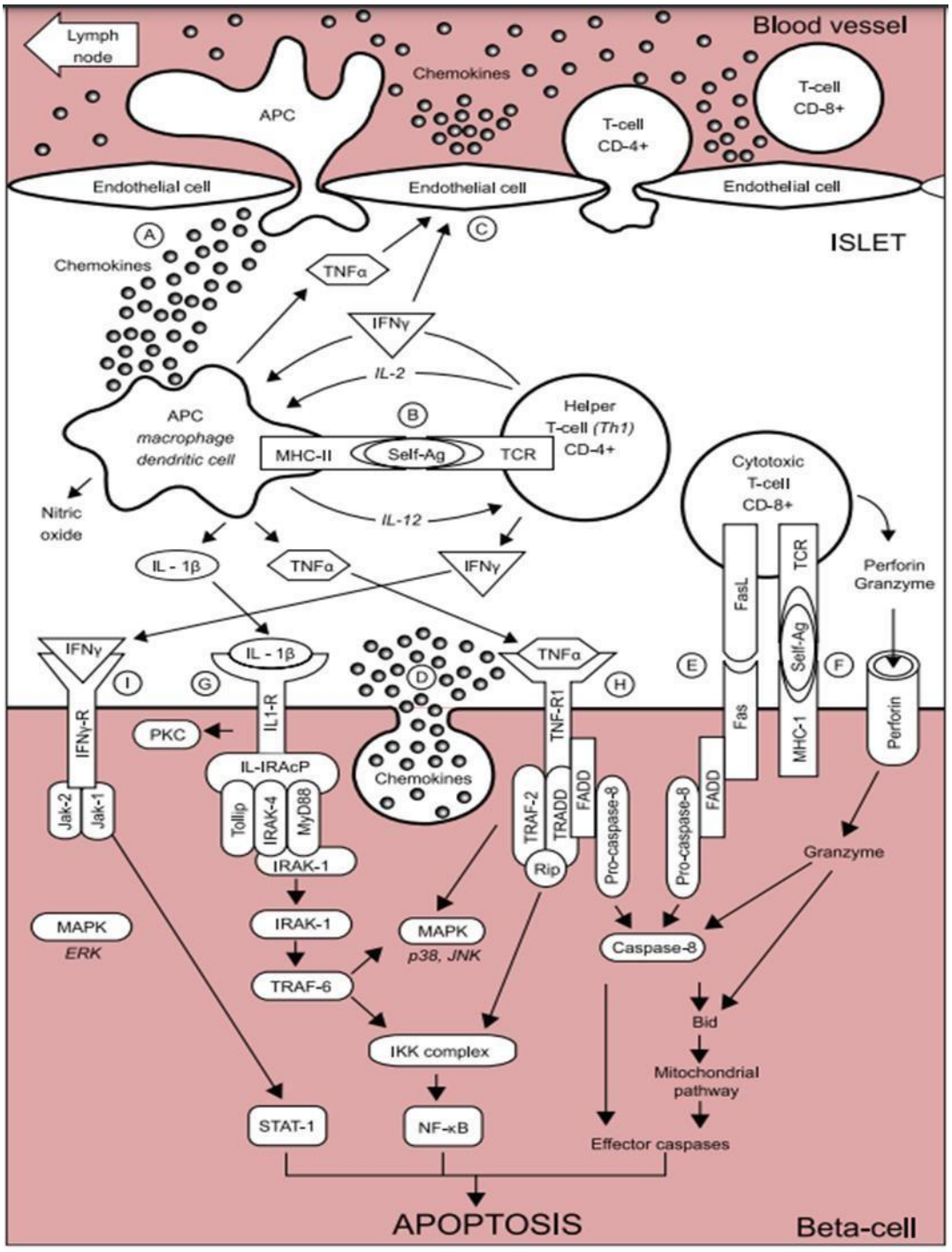


Figura 4: Destrucción de células beta en DM1. (A) Las células presentadoras de antígenos locales liberan citoquinas y quimioquinas que reclutan y activan células T $CD4^+$ y les presentan autoantígenos de las células β. **(B)** Las células T $CD4^+$ estimulan a las células presentadoras de antígeno para que produzcan citoquinas y óxido nítrico (NO). **(C)** Las citoquinas inducen la secreción de quimioquinas por parte de las células endoteliales, favoreciendo el reclutamiento de células T citotóxicas ($CD8^+$). **(D)** Las células β por también secretan quimioquinas en respuesta a infecciones víricas o citoquinas, promoviendo también al reclutamiento y activación de células inmunes. Los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos inducen apoptosis en las células β por la **(E)** vía Fas y **(F)** el sistema de las perforinas/granzimas. Las citoquinas, además pueden activar receptores

de superficie presentes en las células β: **(G)** La IL-1β es capaz de activar al factor nuclear NF-κB, la proteína quinasa c (PKC), p38 y JNK. **(H)** El TNF- α es capaz de activar la vía de caspasa-8, p38-MAPK, JNK y NF-κB. **(I)** El IFN-γ activa la vía de STAT1. Imagen modificada de Tomita, 2017.

2.4 Complicaciones asociadas a la DM1. Efectos de la respuesta inmune

La creciente prevalencia de la diabetes tiene un impacto considerable en los sistemas de salud y las economías de los países. Las complicaciones relacionadas con la DM1 incluyen enfermedades cardiovasculares, renales, retinopatías, ceguera, neuropatía, así como problemas de salud mental y periodontales. Los problemas persistentes incluyen daños a nivel arterial, lo que provoca ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares (Banday et al., 2020). Debido a que la glucosa es el principal metabolito utilizado por el cerebro en estado fisiológico normal, los cambios en la homeostasis de la glucosa pueden que esta sufra alteraciones estructurales y funciónales, pudiendo ocasionar la pérdida de masa neuronal, la reorganización sináptica y de la degeneración de regiones cerebrales causando entre otras cosas la aparición de disfunción cognitiva leve y un aumento en las posibilidades de desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o Parkinson (Sebastian et al., 2023; Wrighten et al., 2009; Jolivalt et al., 2010).

Las complicaciones relacionadas con la diabetes, en términos generales, se clasifican en problemas microvasculares y macrovasculares. Las complicaciones microvasculares incluyen neuropatía, nefropatía y retinopatía (“Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus,” 2010). Comprender y abordar estas consecuencias para la salud es fundamental para las estrategias integrales de manejo y prevención de la DM1.

El desarrollo de complicaciones derivadas de la DM1 puede verse influido por los niveles de glucemia, que contribuyen a la generación de productos de glicación avanzada (AGEs), así como al incremento en de presencia de ROS debido a la activación de rutas metabólicas por altos niveles de glucosa (Brownlee, 2001; Melendez-Ramirez et al., 2010), y la inflamación (Tuleta & Frangogiannis, 2021) que contribuyen a la aparición de las complicaciones crónicas como la retinopatía, nefropatía y neuropatía, diabéticas entre otras (Reynolds et al., 2023).

El control de glucemia ha sido la piedra angular en el manejo de la DM1, sin embargo, existen evidencias de que un buen control de los niveles de glucosa en sangre no es garantía ante el desarrollo de en menor o en mayor grado algún tipo de complicación asociada a la diabetes (Katsarou et al., 2017). La aparición de complicaciones no es causa exclusiva de la hiperglucemia, sino que participan otros actores como el sistema inmunitario o la variabilidad genética (Melendez-Ramirez et al., 2010; Rübsam et al., 2018; Wołoszyn-Durkiewicz & Myśliwiec, 2019).

2.4.1 *Nefropatía diabética*

La nefropatía diabética (ND) como complicación asociada de la diabetes, es considerada comorbilidad a dicha patología, dado que la disfunción renal supone un incremento en la mortalidad por diabetes (Wada & Makino, 2013). La ND según estudios recientes afecta a hasta el 30% de los afectados por DM1 (Bonner et al., 2020).

La ND tiene una progresión lenta (10-20 años) y durante la mayoría de este tiempo es asintomática. La exposición constante a elevadas concentraciones de glucosa junto con el estado proinflamatorio persistente provoca daños en la estructura de las nefronas y las células que los componen, así como los vasos sanguíneos que las irrigan. La pérdida de capacidad funcional en el filtrado glomerular genera alteraciones en los patrones de proteínas excretadas en orina, como la albúmina, ocasionando albuminuria y proteinuria (Gnudi & Long, 2020) que conlleva a una insuficiencia renal y la principal causa por la cual los pacientes necesitan diálisis (Samsu, 2021).

Parte del problema original en la ND está centrado en los procesos vasculares que se producen; sin embargo, las evidencias del papel de la inflamación en el desarrollo y progresión de la ND coexisten con la base patológica vascular. Durante el desarrollo de la ND, se produce un microambiente proinflamatorio por la presencia de mediadores inflamatorios: TNF-α, TGF-β, IL-1β y acumulación de células inmunes, que propician el daño tisular renal. Asociado al daño tisular, se activan procesos de transición epitelio-mesénquima o EMT (del inglés *Epithelial Mesenchima Transition*) ocasionando fibrosis renal (Donate-Correa et al., 2020; Gnudi et al., 2016; Samsu, 2021). El proceso de transición EMT en las células del riñón hace que pierdan sus uniones, además de generar matriz extracelular (colágeno y fibronectina) en las regiones intersticiales promoviendo el engrosamiento de esta región. La acumulación de matriz extracelular junto con la

pérdida de células funcionales por parte de las nefronas, contribuyen a que a la larga se acabe desarrollando una insuficiencia renal (Tuleta & Frangogiannis, 2021).

2.4.2 *Neuropatía diabética periférica*

La neuropatía diabética periférica (NDP) es una enfermedad causada por el daño a los nervios periféricos, que en los pacientes se manifiesta en forma de dolor y ataxia. Es una enfermedad crónica y de lento desarrollo (Bansal et al., 2006). Los síntomas aparecen primero en las extremidades y son de carácter sensorial y después motor. Los primeros síntomas sensoriales son la aparición de hormigueo, sensación de quemazón o disestesia (percepción táctil anormal o desagradable), en los casos más avanzados se da la hiperalgesia (respuesta exacerbada al dolor), entumecimiento, pérdida de sensibilidad y pueden darse incluso dificultades para la marcha. En el caso de la pérdida de sensibilidad en pacientes con DM1 se da frecuentemente en los pies haciéndolos más propensos a sufrir heridas y que estas pasen desapercibidas como el pie diabético (Nascimento et al., 2016).

La NPD afecta significativamente a la calidad de vida de los pacientes con diabetes ya que se pueden ver afectados de varios sistemas autónomos como los sistemas gastrointestinales, cardiovascular y genitourinario, pudiendo causar en los pacientes disfagia, gastroparesia (enlentecimiento de la motilidad gástrica), estenosis esofagal, entre otros (Feldman et al., 2019).

La fisiopatología de la NDP es multifactorial, ya que están implicadas en su desarrollo y progresión la autoinmunidad, la homeostasis metabólica que induce en las células estrés oxidativo, además de la acumulación de productos de glicación avanzada, disfunción mitocondrial y los daños vasculares (Zakin et al., 2019). Todos estos mecanismos afectan tanto a las neuronas como a las células gliales, un ejemplo de esto es la disfunción en las células de Schwann, provocando de esta forma perdida de mielinización en los axones, además de pérdida de suporte estructural y de soporte en forma de nutrientes y factores de crecimiento, haciendo que la neurona pierda capacidad funcional. El principal causante de la NDP es la hiperglicemia, aunque varios estudios han demostrado que un estado proinflamatorio promueve el desarrollo de la NDP favoreciendo la disfunción y muerte de neuronas y de células gliales, debido al estrés constante al que estas están sometidas (Feldman et al., 2019; Nascimento et al., 2016).

El término pie diabético es el nombre que se le ha dado a un conjunto de patologías como la NDP, enfermedad vascular, úlceras en el pie, osteomielitis (infección del hueso) que se dan en pacientes que sufren diabetes y que en casos graves pueden ocasionar amputaciones menores o mayores. De hecho, la diabetes mellitus es la causa principal de amputación de miembros inferiores después de los traumatismos y supone un riesgo hasta 20 veces superior en población con diabetes. La mayoría de los pacientes que requieren de amputación, desarrollaron antes úlceras, por lo que es necesario que todas las estrategias se centren en su prevención.

La patogénesis del pie diabético es compleja, debido a la gran cantidad de factores que actúan en ella, como lo son el padecer NDP, infecciones, enfermedad vascular periférica, hiperglucemia, inflamación… y se desarrolla por la combinación de estos factores, aunque es la NDP la considerada como más importante. Existe asociación entre el desarrollo de NDP y la presencia de otras complicaciones como ND o retinopatía diabética (Ahmad, 2016; Khanolkar et al., 2008).

2.4.3 *Problemas cardiovasculares*

La diabetes es considerada como un factor de riesgo en el desarrollo de problemas cardiovasculares afectando principalmente al corazón (Miki et al., 2013). En estadios preclínicos es asintomático, pero se empiezan a presentar disfunciones estructurales y funcionales en el miocardio como hipertrofia del ventrículo izquierdo o fibrosis que puede ir evolucionando hasta llegar a generar problemas en la diástole llegando en casos más graves a provocar insuficiencia cardíaca (Lorenzo-Almorós et al., 2022; Hölscher et al., 2016).

La activación del sistema inmune y la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNFα, IL-6 e IL-8 que mediante la activación de NF-κB promueven la formación del inflamasoma que promueve la liberación de IL-1β favoreciendo de esta forma a mantener un estado proinflamatorio en el miocardio que conlleva la producción de más citoquinas proinflamatorias y el reclutamiento/activación de células inmunes aumentando el daño que sufre el miocardio (Jia et al, 2018).

2.4.4 *Retinopatía diabética*

La retinopatía diabética (RD) es una complicación crónica de la diabetes, siendo esta la forma más común de pérdida de visión en la población activa. La RD puede dividirse en dos fases, la no proliferativa (NPDR del inglés *Non-Proliferative Diabetic Retinopathy*) y la proliferativa (PDR del inglés *Proliferative Diabetic Retinopathy*). NPDR aparece inicialmente, con el aumento la permeabilidad de la vasculatura y la aparición de aneurismas y exudados, así como pequeñas hemorragias (Duh et al., 2017; Lechner et al., 2017; Wang & Lo, 2018). En el caso de PDR, presenta angiogénesis con fragilidad de los vasos, provocando abundantes hemorragias y pueden llegar a ocasionar incluso desprendimientos de la retina con pérdida de función visual (Stitt et al., 2016).

Durante la RD, la causa más común de pérdida de visión es debida al edema macular diabético, caracterizado por una pérdida en el grosor de la mácula de la retina, y por tanto de la agudeza visual.

Para tratar la RD actualmente se usan fármacos y procedimientos quirúrgicos dirigidos a controlar los problemas de carácter vascular, entre estos tratamientos se incluyen inyecciones anti-VEGF o fotocoagulación entre otras (Stitt et al., 2016; Wang & Lo, 2018).

Tradicionalmente, la RD ha sido catalogada como una enfermedad de origen vascular, pero cada vez se tienen más evidencias del papel tan importante que juega el sistema inmune y en especial la inflamación en su desarrollo y progresión. (Rübsam et al., 2018; Arroba et al., 2016; Cano-Cano et al., 2021).

La retina, como parte del sistema nervioso central (SNC), presenta privilegio inmunológico, gracias a la barrera hemato-retiniana (BHR) que regula la entrada de metabolitos y células inmunes. La retina al igual que el resto del SNC presenta células inmunes propias, denominadas microglía, la cual realiza las funciones de fagocitosis, secreción de factores neurotróficos y producción de mediadores inflamatorios (Rudraraju et al., 2020). En el desarrollo de la RD, y debido a los procesos inflamatorios, así como al estrés oxidativo persistente durante la DM1, la BHR se vuelve más permeable permitiendo así el paso a la retina de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores inflamatorios, además se ha descrito la infiltración de células inmunes del sistema

periférico (monocitos, macrófagos y linfocitos). Los eventos descritos asociados a la RD, sumado a la activación de la microglía que libera diferentes citoquinas y quimioquinas, promueven el reclutamiento de más células inmunes (Duh et al., 2017; Grigsby et al., 2014). Todo esto, contribuye al daño que conlleva la pérdida de función visual (Langmann, 2007; Lechner et al., 2017).

Debido a la conexión de la retina con el sistema nervioso central, las técnicas de imagen se están utilizando cada vez más para la detección temprana y no invasiva de enfermedades neurodegenerativas y/o neuroinflamatorios como el Alzheimer, Parkinson, Huntington, Esclerosis múltiple… ya que se ha comprobado que estas provocan alteraciones a nivel de la retina (Christinaki et al., 2022; Vujosevic et al., 2023). Actualmente, para la detección y el control de la RD y otras patologías retinianas, se utilizan técnicas de imagen como la retinografía o la tomografía de coherencia óptica (del inglés *Optical Coherence Tomography*). La retinografía proporciona imágenes detalladas del fondo de ojo pudiendo de esta forma observar si hay alteraciones en esta, que serían indicativas de procesos patológicos como la presencia de hemorragias, exudados o cambios en los vasos sanguíneos como aneurismas o neovascularización (Cunha et al., 2018). Por otro lado, a través de la OCT podemos obtener también imágenes del fondo de ojo como en la retinografía, pero también de las capas que conforman a la retina, pudiendo así detectar daños a nivel tisular además de los mencionados en la retinografía como la aparición de edemas o pérdida de grosor en las capas de la retina (De Clerck et al., 2015).

Gracias a la OCT nuestra comprensión de los mecanismos fisiopatológicos que afectan a la retina en varias enfermedades mediante la detección y seguimiento de unas estructuras encontradas en cualquier región de la retina, estas estructuras se presentan como señales con una alta capacidad reflectiva, con forma punteada. Estas estructuras reciben el nombre de HRF (del inglés *Hyper-reflective foci*) y se han encontrado en varias patologías relacionadas con la retina como la degeneración macular asociada a la edad, el síndrome isquémico ocular o la RD, siendo esta última la patología en la que están siendo más estudiados (Fragiotta et al., 2021; Huang et al., 2022).

Los HRF en la RD se detectan por todas las capas de la retina en distintas etapas de progresión de la RD aunque su origen a día de hoy sigue siendo un misterio, ya que algunos autores consideran que pueden ser exudados, acúmulos de lipofucsina o

lipoproteínas (Yoshitake et al., 2019; Vujosevic et al., 2017; Zhu et al., 2022) (**Figura 5**), aunque actualmente la teoría más aceptada es que se deben a células de microglía activa, por tanto los HRF serían muy útiles como biomarcadores de la inflamación local (Midena et al., 2018; Pilotto et al., 2022; Turgut & Yildirim, 2015; Vujosevic et al., 2013, 2017, 2023).

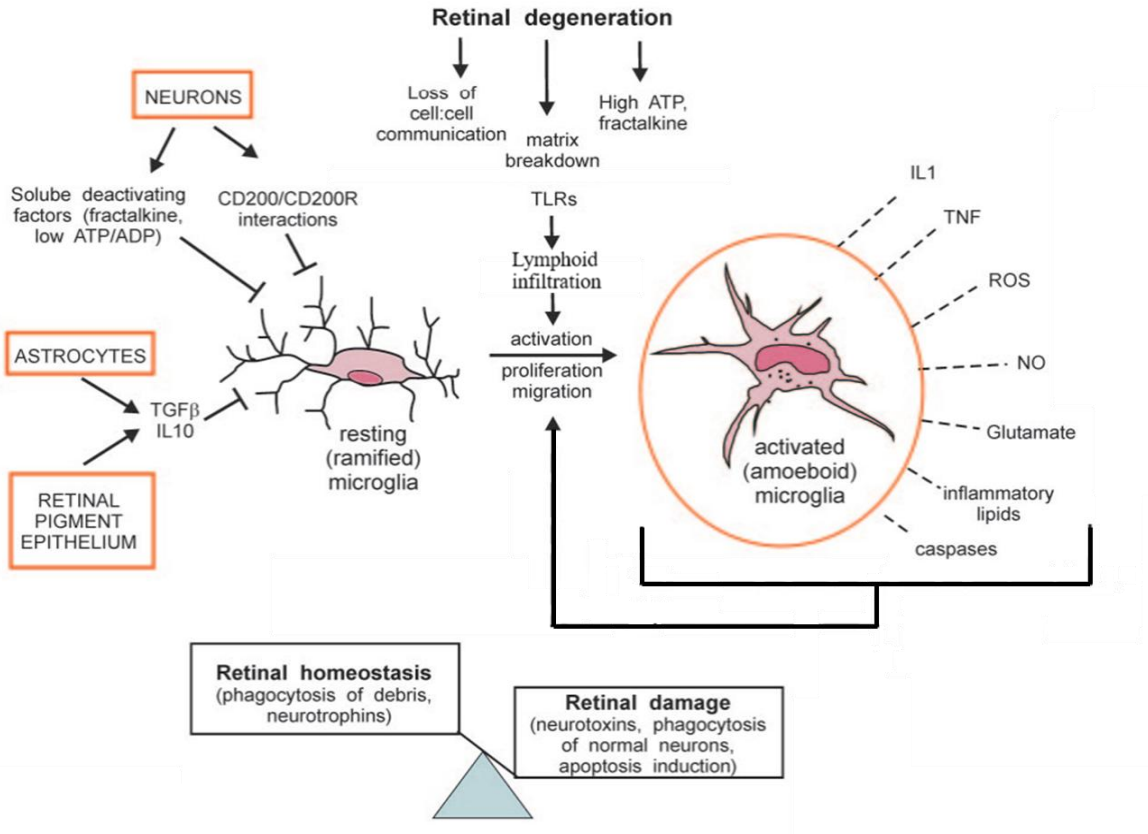


Figura 5: Mecanismos de quiescencia y activación microglial. La microglía sufre cambios morfológicos según su actividad, así pues, la microglía en reposo presenta una morfología ramificada en la cual se dedica a tareas de mantenimiento de la homeostasis retiniana mediante contactos con las diferentes células que lo componen. Varios desencadenantes pueden afectar a la activación de la microglía (degeneración retiniana, pérdida de señalización, activación de señales vía TLR…) haciendo que esta adquiera una morfología ameboide y que comience a liberar varias moléculas inicialmente para la protección/reparación del tejido, pero si este estado de activación se vuelve crónico acaba causando daños a las células de la retina. Imagen modificada de Langman, 2007.

2.5 Biomarcadores

El término biomarcador se refiere a cualquier molécula biológica, cuya presencia nos

ayuda al cribado, diagnosis, caracterización y monitorización de procesos patológicos, permitiéndonos de esta forma el desarrollo de terapias individualizadas. Los buenos biomarcadores son aquellos que pueden ser medidos sin que presenten una alta variabilidad, una baja tasa de falsos positivos/negativos y debe modificarse de una forma rápida y confiable como expresión de respuesta a las diferentes terapias propuestas. (Aronson & Ferner, 2017).

Hasta la fecha, se han descrito varios biomarcadores en la DM1 como IA-2A o GADA entre otros, utilizados en la práctica clínica para la tipificación de la DM1, pero aun así no son lo suficientemente discriminativos para abordar la heterogeneidad inherente a la progresión de la enfermedad. Actualmente se están realizando diversos estudios, utilizando las células T, para identificar los procesos de mantenimiento de la tolerancia y cuando estos fallan, así como en el desarrollo de autoinmunidad pudiendo de esta forma dilucidar mejor el desarrollo de la patología (Mathieu et al., 2018).

En la búsqueda de biomarcadores, los fluidos biológicos se presentan como candidatos elegibles, ya que pueden obtenerse de manera no invasiva y en tiempo real del progreso de la DM1. La sangre periférica, es uno de los fluidos biológicos más utilizados y con un gran potencial, dado que presenta distintas poblaciones celulares, proteínas y otros potenciales biomarcadores (Nakayasu et al., 2023; S. Sarkar et al., 2023).

A partir de muestras sanguíneas, se puede obtener suero en el que identificar biomarcadores asociados a la DM1. Durante el desarrollo de la DM1 se produce la secreción de mediadores inflamatorios, los cuales se han propuesto como potenciales biomarcadores en DM1 por su papel en el desarrollo de la insulitis y posterior pérdida de las células β. Un problema subyacente es que los mediadores inflamatorios no presentan una acción órgano específica, y pueden verse alteradas por otros procesos que involucren inflamación (Yi et al., 2018).

La normalización en el uso de técnicas de imagen como la OCT, ha permitido identificar potenciales biomarcadores en el desarrollo de la DM1 (Simó & Hernández, 2014). Esta técnica nos permite obtener imágenes de las capas que componen la retina, además de imágenes del fondo de ojo, permitiéndonos observar la presencia de alteraciones en cualquiera de estos. Durante la RD, se produce una degeneración de las neuronas y células ganglionares, causando un adelgazamiento de estas capas y la posible presencia de edemas, exudados, hemorragias y/o proliferación de vasos sanguíneos, eventos que

denotan el desarrollo de RD antes incluso de que el paciente sea capaz de percibir algún tipo de disfunción visual (De Clerck et al., 2015; Jenkins et al., 2015).

2.5.1 *Ómicas y su utilidad en la detección de biomarcadores en la DM1*

Desde la secuenciación del genoma humano, se han producido grandes avances en varias tecnologías que nos han facilitado la medición simultánea y paralela de diversas moléculas biológicas como pueden ser el ARN, las proteínas y los metabolitos (Dzau & Ginsburg, 2016). Esto hace que tengamos una vasta cantidad de datos que nos ayudan a dilucidar de una manera más precisa, procesos que hasta el momento eran inalcanzables dándonos así por ejemplo numerosos biomarcadores candidatos para la detección y/o seguimiento de diferentes procesos patológicos. Las tecnologías que nos permiten la medición de tales moléculas biológicas reciben el nombre de ómicas y dentro de estas se pueden diferenciar la proteómica, genómica, transcriptómica, lipidómica, metabolómica y epigenómica (Long & Linsley, 2024), además de los nuevos abordajes como la miRNomica, metalomica, etc…

La utilidad de las ómicas en distintas patologías presenta el desarrollo de nuevos abordajes diagnósticos y terapéuticos (Lorena et al., 2023; Tsakiroglou et al., 2023; Xie et al., 2018). También ha habido numerosos esfuerzos de la comunidad científica para la realización de estudios ómicos en la DM1, como el Human Diabetes Proteome Proyect (Topf et al., 2013).

De las distintas ómicas, la proteómica es la única que ha sido capaz de describir potenciales biomarcadores de progresión de la DM1 que están cercanos a ser validados (Johar et al., 2019; Nakayasu et al., 2023). El primer descubrimiento de un potencial biomarcador fue realizado por Mannering et al., 2005, en cuyo estudio demostró que una modificación en la cadena A de la insulina podría estar relacionada con la patofisiología de la DM1 y desde entonces se han descrito una gran cantidad de modificaciones postraduccionales que pueden dar explicación a ciertas facetas de la patología y presentan un potencial terapéutico.

Actualmente, muchas aproximaciones experimentales para la obtención de datos proteómicos se están centrando en fluidos biológicos de fácil acceso como lo son la orina, el suero, las secreciones lacrimales o la saliva de los pacientes, debido a la no implicación de procedimientos invasivos para su obtención. En el caso de la orina ya hay estudios que

muestran potenciales biomarcadores para la DM1 como PROZ para el desarrollo de complicaciones asociadas a la diabetes como la RD o ND (Khan et al., 2020), además de se ha detectado proteínas que están sobre o infraexpresadas al compararlas con individuos sanos, la mayoría de estas cumplen funciones de: catabolismo lipídico, degradación proteica, inflamación, regulación metabólica y apoptosis (Burch et al., 2015; Johar et al., 2019). Respecto al suero, es actualmente el fluido biológico en cual se están realizando más investigaciones proteómicas para la búsqueda de biomarcadores. Este enfoque presenta a los investigadores una serie de desafíos debido entre otras cosas al amplio rango de abundancia de proteínas que presenta, además de por la presencia de proteínas con una muy elevada abundancia como son la albúmina, transferrina y fibrinógeno, que juntas pueden llegar a suponer hasta el 95% del proteoma sérico (Vigneron et al., 2004). Los estudios realizados en muestras séricas han reportado variaciones en proteínas implicadas en procesos relacionados con el sistema inmune innato, la respuesta inmune, coagulación sanguínea y del sistema del complemento (Metz et al., 2008; Zhang et al., 2013).

Aunque el estudio de biomarcadores en los estadios iniciales de la DM1 es de una gran importancia clínica, la búsqueda de biomarcadores indicativos de la evolución de complicaciones asociadas a la diabetes como la RD, también pueden ser de gran ayuda para la detección precoz de estos y posibilitar así un tratamiento adecuado posibilitando el que los pacientes no vean disminuida su calidad de vida. Ya hay estudios que están investigando esto con prometedores resultados, aunque es necesario un mayor esfuerzo e investigación para poder revelar la verdadera aplicabilidad clínica de estos potenciales biomarcadores.

2.6 Potencial de los productos naturales de origen marino en la prevención de la DM1 y sus complicaciones

En la búsqueda de nuevos tratamientos enfocados en la prevención del desarrollo de la DM1, así como en la progresión de la enfermedad y sus complicaciones asociadas, los productos naturales han desempeñado y continúan desempeñando un papel esencial. Se estima que aproximadamente el 40% de los fármacos aprobados durante los últimos 40 años derivan, directa o indirectamente, de compuestos de origen natural (Newman & Cragg, 2016). Debido a su extraordinaria biodiversidad, el medio marino constituye un valioso recurso para la obtención de nuevos compuestos bioactivos. En este sentido, algas,

invertebrados y microorganismos marinos han demostrado ser, a lo largo de las últimas décadas, una fuente prominente de moléculas con potencial biomédico (Hu et al., 2015). Aunque los mayores avances se han producido en el ámbito antitumoral, con varios agentes anticancerígenos derivados de metabolitos marinos ya comercializados (Halaven, Adcetris, Yondelis) y otros en fases clínicas de desarrollo (Newman & Cragg, 2014), numerosos estudios han evidenciado la bioactividad de diversos productos marinos en otras áreas terapéuticas, incluyendo actividades bactericidas, fungicida, antiviral, antidiabética y antiinflamatoria, entre otras (Mayer et al., 2017). En particular, en los últimos años ha surgido un creciente interés por el estudio de las propiedades antidiabéticas de compuestos derivados del medio marino (Lauritano & Ianora, 2016).

La mayoría de los estudios se han centrado en la DM2 y describen la capacidad de distintos extractos y compuestos purificados para inhibir, tanto *in vitro* como *in vivo*, enzimas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos (α-amilasa, α-glucosidasa, aldosa reductasa, entre otras) o la PTP1B (proteína tirosina fosfatasa 1B), así como sus efectos antiobesidad (Zhao et al., 2018; Lauritano and Ianora, 2016). Desde el punto de vista estructural, los compuestos marinos con efectos sobre los niveles de glucosa y/o la acción de la insulina son diversos, e incluyen bromofenoles, florotaninos, terpenoides y carotenoides. Asimismo, existen evidencias sobre el efecto beneficioso de compuestos fenólicos en la prevención de complicaciones asociadas a la DM (Okada et al., 2004).

Sin embargo, la actividad de los productos de origen marino en el contexto de la DM1 ha sido escasamente explorada (Van Kaer, 2001). Recientemente, se ha sugerido que los estudios de cribado orientados a DM1 deberían centrarse en la identificación de moléculas capaces de proteger a las células β pancreáticas, reduciendo la inflamación y el estrés oxidativo (Lauritano and Ianora, 2016). En este sentido, el análisis de las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de estos compuestos sugiere que podrían constituir candidatos prometedores para su estudio en la DM1 y sus complicaciones.

Curiosamente a pesar de la gran cantidad de estudios que se han realizado y se están llevando a cabo en pacientes con DM1, no hay hoy en día ninguna investigación que evalúe la evolución temporal de la enfermedad a nivel proteómico, desde su diagnostico hasta la aparición de las complicaciones asociadas. Debido al componente inmunitario e inflamatorio subyacente en el desarrollo de la enfermedad, el análisis de las PBMCs (del inglés *Pheripheral Blood Mononuclear Cells*) puede ser determinante en el avance del conocimiento de la DM1. Resulta indispensable la incorporación del componente autoinmune e inflamatorio en el estudio de estos biomarcadores que determinaran el

estatus del paciente en cada estadio del progreso de la DM1.

3. Justificación

La diabetes DM1 es una enfermedad autoinmune cuya incidencia global ha aumentado de forma sostenida en los últimos años y se espera que continúe incrementándose. Representa un importante desafío para los sistemas de salud debido a las alteraciones metabólicas e inmunológicas que conlleva, así como por el desarrollo de complicaciones asociadas que afectan significativamente la calidad de vida de los pacientes. Profundizar en los mecanismos intrínsecos de la DM1 resulta esencial para avanzar en el conocimiento biomédico, especialmente en la definición de los procesos inmunitarios iniciales que contribuyen a la destrucción de la célula β pancreática. En este contexto, la identificación del entorno inflamatorio a lo largo de la progresión de la enfermedad es clave para establecer dianas terapéuticas dirigidas al control inmunológico de la DM1 y de sus complicaciones, como la retinopatía o la nefropatía, con implicaciones directas en el diagnóstico, el seguimiento clínico y el pronóstico.

A pesar de los avances alcanzados, el único tratamiento validado para la DM1 continúa siendo la administración de insulina exógena de por vida, y los mecanismos que desencadenan la enfermedad y regulan su progresión no se encuentran completamente dilucidados. Además, la mayoría de los estudios se basan en comparaciones entre individuos sanos y pacientes con DM1, sin tener en cuenta el curso temporal de la enfermedad. Aunque la implicación del sistema inmune como desencadenante de la patología es ampliamente aceptada, los procesos específicos asociados a cada etapa de progresión y su relación con la aparición de complicaciones, como la RD, no están completamente descritos. Por tanto, resulta de gran interés analizar cómo evolucionan los parámetros inmunes e inflamatorios en pacientes con diferentes tiempos de evolución de la enfermedad, con el fin de esclarecer los mecanismos implicados en su progresión y en el desarrollo de complicaciones secundarias.

La presente tesis doctoral se estructura en tres estudios independientes pero interrelacionados, cuyo objetivo global es analizar distintos aspectos de la progresión de la DM1 desde una perspectiva inmunológica e inflamatoria.

El **Estudio I**, se diseñó para caracterizar los cambios en la composición de las subpoblaciones celulares inmunes presentes en las PBMCs a lo largo de la progresión de la enfermedad, así como su capacidad de respuesta inmunitaria. Para ello, se aislaron PBMCs de pacientes en diferentes etapas de la DM1 y se caracterizaron las poblaciones celulares mediante citometría de flujo. Paralelamente, se evaluó la expresión de

citoquinas y factores de transcripción asociados a la diferenciación de estas poblaciones mediante qRT-PCR. Con el fin de explorar posibles estrategias terapéuticas inmunomoduladoras, se realizaron cultivos de PBMCs sometidos a estimulación con lipopolisacárido (LPS) para mimetizar un contexto inflamatorio, evaluando el potencial efecto inmunomodulador de un compuesto sintético estructuralmente derivado de moléculas marinas denominado 3-(2,4-dihidroxyphenyl)phthalide (M9) en presencia y ausencia de LPS.

El **Estudio II,** tuvo como objetivo evaluar y caracterizar el perfil inflamatorio sistémico de pacientes con DM1 en distintas etapas de progresión. La identificación de estos procesos inflamatorios y de las vías de señalización implicadas permitiría definir posibles dianas terapéuticas relacionadas con el origen o la perpetuación de la enfermedad. Para ello, se aislaron muestras de suero de pacientes estratificados según tiempo de progresión y se cuantificaron múltiples mediadores inflamatorios mediante un sistema multiplex. Los resultados permitieron identificar perfiles inflamatorios sistémicos diferenciados en función del momento evolutivo, así como moléculas clave relacionadas con el desarrollo de complicaciones, particularmente la RD.

El **Estudio III**, mediante análisis proteómico de alta resolución, determinó las variaciones en la expresión proteica de PBMCs procedentes de pacientes estratificados en dos grupos según el tiempo de progresión de la enfermedad. La identificación de estas variaciones permitió definir procesos celulares y vías de señalización alteradas durante la progresión de la DM1, así como el posible papel funcional de dichas proteínas en el desarrollo de la patología.

El desarrollo conjunto de estos estudios, orientados a caracterizar los mecanismos intrínsecos asociados a la progresión de la DM1, proporcionó una visión ampliada del contexto inmune e inflamatorio de la enfermedad. En el planteamiento experimental inicial, los pacientes fueron clasificados en cuatro grupos según el tiempo desde el diagnóstico: A (<3 meses), B (3 meses-1 año), C (1-5 años) y D (>5 años), clasificación utilizada en el Estudio II. Sin embargo, el análisis de los resultados obtenidos en los Estudios I y III reveló que los grupos A y B compartían características fenotípicas y moleculares similares, al igual que los grupos C y D. Esta observación llevó a reagrupar a los pacientes en dos categorías: Early (A+B, ≤12 meses) y Advanced (C+D, >12 meses), permitiendo una interpretación más coherente y robusta de los hallazgos asociados a la

progresión de la DM1.

4. Hipótesis y Objetivos

Los nexos existentes entre la DM1 y los procesos inmunes durante el desarrollo y progresión de la enfermedad pueden determinar el progreso de la DM1, así como el desarrollo de complicaciones asociadas. Los pacientes con DM1 en diferentes estadios temporales de desarrollo, desde su diagnóstico hasta el desarrollo de complicaciones varios años después, presentan perfiles específicos de mediadores inflamatorios como citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas, además de proteínas y variaciones en las células inmunes, íntimamente relacionados con el desarrollo y progresión de la DM1. Una mejor identificación de estos mediadores, proteínas y poblaciones inmunes, nos permitiría ayudar al diagnóstico temprano, el manejo y prevención de la enfermedad y sus complicaciones específicas, además de poder sentar las bases para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas altamente específicas que nos permitan abordar las alteraciones, inmunológicas y metabólicas que subyacen a la enfermedad.

Estudio 1: Identificación de los cambios en las subpoblaciones de células inmunes periféricas durante la progresión de la diabetes mellitus tipo 1

Hipótesis general-H1

La respuesta inmunológica asociada a la DM1 se caracteriza por alteraciones en la composición y función de las poblaciones inmunitarias, favoreciendo un entorno inflamatorio que promueve la progresión de la enfermedad. El tratamiento de PBMCs de pacientes con DM1 con compuestos bioactivos de estructura análoga a metabolitos marinos puede modular dicha respuesta, induciendo un perfil inmunológico antiinflamatorio.

Hipótesis específicas

H.1.1. La DM1 se asocia con cambios cuantitativos y cualitativos en las poblaciones de células inmunes, que reflejan un desequilibrio hacia un fenotipo proinflamatorio.

H.1.2. El tratamiento in vitro de PBMCs de pacientes con DM1 con compuestos bioactivos de origen o estructura marina modula la expresión de genes y citoquinas proinflamatorias, promoviendo una respuesta inmunorreguladora.

H.1.3. Los compuestos bioactivos evaluados inducen un cambio en el perfil de activación de las subpoblaciones de linfocitos T y monocitos, favoreciendo una transición hacia un entorno antiinflamatorio.

Objetivos:

O.1. Determinación de las subpoblaciones celulares inmunes mediante citometría de flujo en cada uno de los grupos de pacientes estratificados según el tiempo de progresión de la DM1.
O.2. Inmunomodular la respuesta inmune e inflamatoria mediada por PBMCs en cultivos *ex vivo*, mediante el tratamiento con compuestos bioactivos de origen marino. Determinar los cambios en la expresión de los factores de transcripción responsables de la diferenciación de las distintas subpoblaciones, así como los mediadores inflamatorios involucrados en las respuestas.
O3. Identificar los cambios inducidos por los tratamientos con moléculas bioactivas de origen marino y su efecto antiinflamatorio en la respuesta inducida en el ambiente diabético.

Estudio 2: **Perfil dinámico de citoquinas en pacientes de Diabetes Mellitus tipo 1 desde su inicio hasta estadios avanzados: Su potencial participación en el desarrollo de retinopatía diabética.**

Hipótesis general-H2
El perfil inflamatorio sistémico presente durante la progresión de la DM1 se asocia con el pronóstico de la enfermedad y con el desarrollo de complicaciones microvasculares, particularmente la retinopatía diabética, pudiendo ser identificado mediante la detección de biomarcadores inflamatorios específicos en suero.

Hipótesis específicas
H.2.1. La caracterización de distintos perfiles inflamatorios en muestras séricas de pacientes con DM1 se asocia con una evolución clínica más favorable o desfavorable de la enfermedad.
H.2.2. El contexto inflamatorio subyacente en la progresión de la DM1 contribuye al desarrollo de complicaciones microvasculares, como la retinopatía diabética.
H.2.3. La identificación de biomarcadores inflamatorios específicos en suero permite establecer una asociación entre el grado de inflamación sistémica y la presencia o riesgo de retinopatía diabética en pacientes con DM1.

Objetivos:

O4. Identificación de los patrones de mediadores inflamatorios en los grupos de pacientes con DM1 estratificados según tiempo de progresión de la enfermedad.

O5. Determinar la asociación de un perfil específico inflamatorio y el desarrollo de alteraciones estructurales en la retina de pacientes con DM1.

O6. Establecer correlaciones entre biomarcadores inflamatorios y parámetros clínicos de las evaluaciones de la retina mediante OCT.

Estudio 3: Firma proteómica inflamatoria en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diabetes mellitus tipo 1: Un patrón diferencial de expresión.

Hipótesis general-H3

Las modificaciones en los niveles y el perfil proteico de PBMCs de pacientes con DM1 se asocian con la alteración de rutas de señalización implicadas en procesos inflamatorios y autoinmunes e inflamatorios. La identificación de biomarcadores proteicos específicos en etapas tempranas de la enfermedad permite establecer una relación entre dichas alteraciones moleculares y el desarrollo de complicaciones microvasculares, como la retinopatía diabética.

Hipótesis específicas

H.3.1. Los cambios en la expresión y modificación de proteínas en las PBMCs de pacientes con DM1 en distintos estadios reflejan la activación o disfunción de vías de señalización asociadas a procesos inflamatorios y autoinmunes.

H.3.2. La comparación de los perfiles proteómicos de PBMCs entre pacientes con DM1 y controles sanos permite identificar proteínas diferencialmente expresadas asociadas a la progresión de la enfermedad.

H.3.3. La detección de biomarcadores proteicos vinculados a rutas de señalización alteradas en PBMCs de pacientes con DM1 en etapas tempranas se correlaciona con un mayor riesgo de desarrollar complicaciones microvasculares, particularmente la retinopatía diabética.

Objetivos

O.7. Análisis proteómico de PBMCs a partir de pacientes con DM1 estratificados según el tiempo de evolución de la enfermedad e identificación de alteraciones en proteínas clave diferenciadoras de cada estadio de la DM1.

O.8. Caracterización de los cambios asociados a procesos inmunes e inflamatorios entre los distintos grupos de estudio.

O.9. Determinación de biomarcadores en etapas tempranas de la DM1 que se asocien con el desarrollo de complicaciones a largo plazo como la retinopatía diabética.

5. ESTUDIOS

5.1 Estudio I

Identificación de los cambios en las subpoblaciones de células inmunes periféricas durante la progresión de la diabetes mellitus tipo 1.

RESUMEN

La DM1 es un trastorno autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las células beta pancreáticas mediada por el sistema inmunitario. La naturaleza y magnitud de esta respuesta inmune varía según el microambiente, lo que resalta la necesidad de delinear los perfiles inmunológicos a lo largo de la progresión de la enfermedad.

En este estudio, reportamos alteraciones dinámicas en la expresión de marcadores de superficie y factores de transcripción que regulan la diferenciación de las PBMCs en diferentes subpoblaciones inmunitarias asociadas con perfiles funcionales específicos. Los análisis por citometría de flujo revelaron cambios marcados en la composición de células inmunes periféricas a lo largo de las etapas de la DM1, incluyendo un aumento en las células T $CD4^+$ y la reducción de las T $CD8^+$ tanto en etapas tempranas como avanzadas de la enfermedad. Las células Th17 se redujeron significativamente durante la fase, pero se reestablecieron en la etapa avanzada, lo que podría reflejar un patrón inflamatorio bifásico o mecanismos inmunoreguladores compensatorios. Las células NK estuvieron consistentemente disminuidas en ambas etapas de la diabetes, mientras que el número de monocitos disminuyó en los pacientes de la etapa temprana, aunque sus niveles se normalizaron al progresar la patología. El perfil de los factores de transcripción indicó una polarización inmunitaria, con aumentos en la expresión de *FOXP3* en los pacientes de etapas avanzadas y una elevación sostenida del ARNm de *RORC* en ambas etapas. Se observaron patrones de expresión específicos de citoquinas en cada etapa: los niveles de ARNm de *IL1B* e *IL8* estuvieron suprimidos en los pacientes de etapa temprana, mientras que la expresión de *IL8* volvió a elevarse en etapas avanzadas. Los niveles de *TNF* e *IFNG* estuvieron consistentemente aumentadas durante toda la progresión de la enfermedad. Es de resaltar que, los pacientes en etapa temprana mostraron una sobreexpresión de genes antiinflamatorios como *ARG1* e *HMOX1*, lo que sugiere la activación de vías reguladoras compensatorias. Al explotar la plasticidad de las PBMCs derivadas de pacientes en estadios tempranos de la diabetes bajo condiciones proinflamatorias en cultivo y siendo

tratadas con moléculas sintéticas de bioinspiración marina, se consiguió atenuar notablemente la expresión de varios mediadores proinflamatorios y se indujo una respuesta antiinflamatoria, mostrando su potencial uso para la modulación inmune en la DM1.

La progresión de la DM1 resulta de una compleja interacción entre mecanismos intrínsecos de la enfermedad y factores sistémicos que influyen en la velocidad de avance. El uso de nuevos compuestos bioactivos inmunomoduladores surge como estrategia prometedora para atenuar la inflamación, mejorando así el manejo a largo plazo de la enfermedad.

Identifying changes in Peripheral Immune Cells subpopulations during type 1 diabetes mellitus progression.

ABSTRACT

DM1 is an autoimmune disease marked by the immune-mediated destruction of pancreatic β cells. Understanding the immunological changes occurring during disease progression is crucial for identifying mechanisms underlying β cell loss and potential therapeutic interventions. In this study, we investigated alterations in immune cell subsets, transcription factors, and cytokine gene expression in PBMCs from patients at different stages of DM1. Flow cytometry revealed significant remodeling of peripheral immune composition, including increased $CD4^+$ T cells and decreased $CD8^+$ T cells in both Early and Advanced-stages. Th17 cells were reduced in Early-stage DM1 but returned to baseline at advanced stages, suggesting biphasic immune regulation. NK cells remained consistently diminished, whereas monocyte counts were transiently reduced in early disease and normalized later. Transcription factor analysis demonstrated immune polarization, with elevated *FOXP3* expression in Advanced-stage patients and persistent upregulation of *RORC* mRNA. Cytokine profiling showed stage-specific differences: *IL1B* and *IL8* were suppressed early but *IL-8* reappeared in Advanced-stage disease, while *TNFA* and *IFNG* transcripts were consistently upregulated. Notably, Early-stage patients exhibited increased anti-inflammatory mediators, including *ARG1* and *HMOX1*, suggesting compensatory regulatory pathways. Importantly, PBMCs from Early-stage patients exposed to synthetic, marine-inspired compounds exhibited reduced pro-inflammatory gene expression and enhanced anti-inflammatory responses. These findings highlight the dynamic interplay of immune mechanisms across DM1 progression and suggest that immunomodulatory bioactive compounds may represent a promising therapeutic strategy to attenuate inflammation, improve long-term management, and enhance clinical outcomes.

MATERIAL AND METHODS

Study participants

A total of 42 patients diagnosed with DM1, according to the criteria established by the American Diabetes Association, were recruited from the Endocrinology and Nutrition Department at University Hospital Puerta del Mar in Cádiz, Spain. The inclusion criteria for DM1 were: 1) continuous insulin therapy since diagnosis, 2) good glycemic control, 3) absence of unrelated chronic infectious diseases, and 4) absence of other autoimmune/inflammatory conditions. Good glycemic control was defined as having glycated hemoglobin (HbA1c) less than or equal to 7%. Additionally, 23 healthy volunteers from the same geographical area and ethnic background as the DM1 patients were included as the Healthy control group (H). These individuals had no history of chronic infectious diseases, major illnesses (similar to those excluded from the DM1 group), or any immunological disorders. To analyze disease progression, the enrolled patients were divided into two groups based on disease duration since onset: Early (≤12 months) and Advanced (>12 months).

PBMCs isolation

PBMCs were isolated using a standard density gradient centrifugation protocol with Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Cells were washed twice to ensure complete removal of plasma. Cell viability was assessed with Trypan Blue exclusion and remained consistently high (96-98%) prior to freezing.

The resulting cell pellets were divided into two fractions. One fraction was resuspended in a cryopreservation solution consisting of heat-inactivated fetal bovine serum and 10% DMSO, gradually frozen using in a Frosty container at -80ºC for 24 hours and subsequently transferred to liquid nitrogen for long-term storage and later flow cytometry analysis. The second fraction, containing one million cells, was snap-frozen without any liquid medium and stored at -80°C until mRNA extraction.

Cell labeling and flow cytometry

PBMCs were thawed and incubated for 2 hours in a culture medium composed of RPMI 1640 medium supplemented with 1% of HEPES, sodium pyruvate, non-essential amino acids (NEAA), glutamine (all come from GIBCO, New York, USA), penicillin/streptomycin (Biowest, Nuaillé, France), and 5% heat-inactivated human serum (Millipore Sigma, Massachusetts, USA) prior to experimental procedures.

Following the resting period, 250,000 cells were stained with LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Dyes (Invitrogen, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's protocol. Fc receptor blocking (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) was performed prior to surface marker staining. The antibodies used for surface staining are detailed in **Supplementary Table 1**.

Cells were subsequently fixed using the Foxp3 Staining Buffer Kit (Invitrogen, Massachusetts, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The samples were analyzed using a Celesta SORP flow cytometer (BD, New Jersey, USA) and data were processed using FlowJo software, v10.8.

mRNA extraction and quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) analysis

For RNA extractions, Trizol® reagent (Invitrogen, Madrid, Spain) was used, followed by reverse transcription into cDNA using the SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for qPCR, according to the manufacturer's instructions.

qRT-PCR was performed on a QuantStudio 12K Flex RT-PCR system (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) in 384-well plates. The primer and probe sequences are provided in **Supplementary Table 2**.

***In vitro* treatment PBMCs**

PBMCs from patients in the Early-stage DM1 were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 1% of HEPES, sodium pyruvate, NEAA, glutamine, penicillin/streptomycin and 5% human serum at a density of 300,000 cells per well. Cells were allowed to rest in the incubator for 1.5-2 hours at 37°C with 5% CO_2. Subsequently, lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/mL) was added to induce a pro-inflammatory environment, either alone or in combination with M9 (20 μM), and cells were incubated for an additional 24 hours at 37 °C. Basal control wells received the corresponding vehicle under identical conditions.

Study approval and participant consent procedures

For this study, written consent was provided to all participants, or their legal guardians if they were under 18 years old, all in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. All the data obtained were pseudo-anonymized to avoid identification of the participants and stored in a secure database only accessible to the research team. The Institutional Research Ethics Committee of the Province of Cádiz (registration number

05.23) approved this study.

Statistical analysis

Graphs were generated using GraphPad Prism v8 and statistical analyses were conducted with IBM SPSS Statistics v22. Data were assessed for normality and homogeneity of variances using the Shapiro-Wilk normality and Levene's tests. For parametric variables, one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc analysis was applied. For non-parametric variables, the Kruskal-Wallis test followed by Dunn´s post hoc test was used. Bivariate correlations between flow cytometer and qRT-PCR variables were evaluated using Spearman´s rank correlation coefficient (non-parametric data).

A p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Results are presented as mean ± standard deviation (SD).

RESULTS

Demographic characteristics

A total of 42 patients and 22 healthy volunteers were enrolled in this study. Sociodemographic and clinical data for the different groups are presented in **Table 1**. Statistically significant differences were observed in several parameters, including, age, basal glucose, insulin dose, C-peptide and and HbA1c. Differences in basal glucose, C-peptide and HbA1c. Compared to the Healthy control group, all disease stages exhibited significant differences in basal glucose, C-peptide and HbA1c levels.

Furthermore, significant differences in insulin dose and age were identified between the Early and Advanced-stage DM1 groups. The Healthy group also showed distinct alterations in glucose metabolism parameters, specifically in basal glucose, C-peptide, and HbA1c.

Table 1: Diabetes-specific characteristics of DM1 and Healthy groups

Variable	Healthy (n=22)	DM1 groups (n=42)		*p*-value
		Early (n=17)	Advanced (n=25)	
Demographic parameters				
Age (years)	31.29 ± 1.82	27.87± 2.92	41.91 ± 2.28	**0.026**[b, c]
Gender (F/M)	13/9	7/10	15/10	
Biochemical parameters				
Insulin dose (UI)	-	24.25 ± 2.48	51.72 ± 5.96	**<0.001**
Basal glucose (mg/dL)	90.44 ± 1.67	146.00 ±17.68	143.43 ± 18.48	**0.006**[a, b]

ACRU (mg/g)	7.55 ± 1.31	9.02 ± 2.07	10.70 ± 2.51	0.653
C-peptide (ng/mL)	1.91 ± 0.29	0.79 ± 0.11	0.68 ± 0.29	**0.015**[a, b]
A1c (mmol/mol)	28.27 ± 8.99	68.43 ±5.47	55.78 ± 2.11	**0.037**[a,b]
HbA1c (DCCT%)	4.73 ± 0.09	8.49 ± 0.60	7.18 ± 0.21	**0.041**[a,b]

Data is represented as mean ± SD. ANOVA, Kruskal-Wallis or Mann-Whitney *U*-test was performed to assess significant differences between groups (*p*-values are in the table), and for post-hoc analysis Bonferroni or Dunn´s test were used to pair comparations. Significant differences were set at $p \leq 0.05$ and are marked in bold as follows: [a] Healthy *vs* Early; [b] Healthy *vs* Advanced; [c] Early *vs* Advanced.

Cellular composition alterations in peripheral immune cells in DM1

The distribution of peripheral immune cell subsets, including T lymphocytes ($CD4^+$, $CD8^+$, Th1, Th2, Th17), NK cells, B lymphocytes, and monocytes, is presented as *p*-values reflecting intergroup differences (**Table 2**).

An increased proportion of $CD4^+$ T cells was observed in patients with Advanced-stage DM1 compared to both Healthy controls and individuals with the Early-stage disease (**Figure 1**). Subset analysis of memory $CD4^+$ T cell revealed a significant expansion in the Advanced-stage group relative to both control and Early-stage groups (Table 2). In contrast, naïve $CD4^+$ T cells were significantly diminished in both DM1 cohorts compared to Healthy controls. Additionally, a marked reduction in the overall $CD8^+$ T cell population was noted in DM1 patients, with the Advanced-stage group exhibiting a particularly pronounced decrease in the naïve $CD8^+$ T cells subset relative to both Healthy and Early-stage counterparts (**Table 2**; **Figure 1**).

Th1 cell frequencies were significantly lower in the Advanced-stage group compared to controls, whereas no significant differences were detected in Th2 T cell proportions among the study groups. Interestingly, Th17 cell frequencies were significantly reduced in the Early-stage DM1 group in comparison to both controls and Advanced-stage group (**Table 2**).

Analysis of B cell subpopulation revealed a significant increase in the Advanced-stage group compared to Healthy controls (**Figure 1**). In contrast, NK cell frequencies were significantly decreased in both DM1 groups relative to controls (**Figure 1**). With respect to monocyte subsets, a significant reduction was observed in the Early-stage group compared to both the Advanced-stage group and Healthy controls (**Figure 1**).

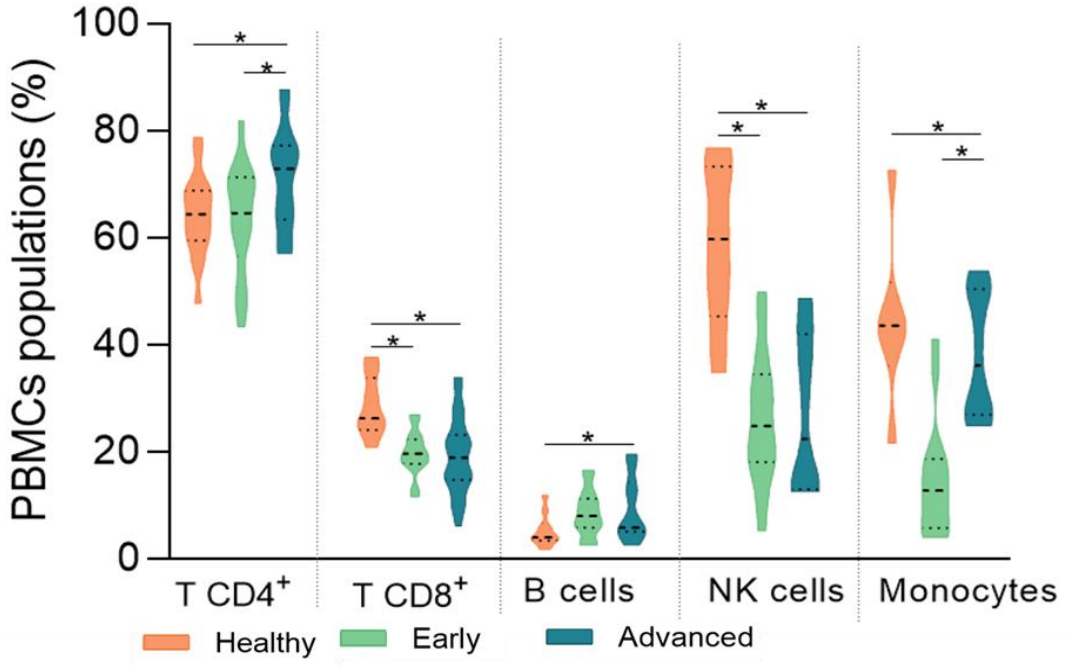


Figure 1: Flow cytometry analysis of $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, B cells, NK cells and monocytes in PBMCs from individuals with DM1 and the Healthy controls. Violin plots represent the distribution of the percentage of immunological cell subpopulations within each study groups: $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, B cells, NK cells and monocytes. Statistically significance (*p*-value ≤0.05) is represented as *. Mean values are indicated by bold lines; dots represent the quartiles.

Table 2: Alterations in immunological cell subpopulations in peripheral blood among Healthy controls and DM1, stratified by disease stage.

Cell populations (%)	Markers	Healthy (n=22)	DM1 groups (n=42)		*p*-value
			Early (n=17)	Advanced (n=25)	
T-cells	$CD3^+$	51.61 ± 4.55	46.90 ± 5.40	52.20 ± 5.50	0.126
T-helper	$CD3^+$ $CD8^-$ $CD4^+$	64.20 ± 1.88	63.51 ± 2.50	71.15 ± 1.87	**0.033**[b,c]
T-helper memory	$CD3^+$ $CD8^-$ $CD4^+$ $CD45RO^+$	43.62 ± 2.89	48.14 ±3.47	59.56 ± 2.62	**0.002**[b,c]
T-helper naïve	$CD3^+$ $CD8^-$ $CD4^+$ $CD45RA^+$	44.65 ± 2.74	32.14 ± 3.95	31.93 ±2.71	**0.012**[a,b]
T-helper 1	$CD3^+$ $CD8^-$ $CD4^+$ $CD45RO^+$ $CXCR3^+$	54.52 ± 2.85	51.46 ± 3.36	38.68 ± 3.37	**0.007**[b,c]
T-helper 2	$CD3^+$ $CD8^-$ $CD4^+$ $CD45RO^+$ $CD294^+$	2.92 ± 0.21	3.73 ± 0.41	3.15 ± 0.30	0.418
T-helper 17	$CD3^+$ $CD8^-$ $CD4^+$ $CD45RO^+$ $CCR6^+$	35.30 ± 2.65	12.92 ± 2.07	26.37 ± 1.84	**<0.001**[a,b,c]
T-cytotoxic	$CD3^+$ $CD8^+$ $CD4^-$	28.52 ± 1.40	19.69 ± 1.08	19.09 ± 1.46	**<0.001**[a,b]

T-cytotoxic memory	$CD3^+$ $CD8^-$ $CD4^+$ $CD45RA^+$	23.10 ± 1.43	18.59 ± 1.33	26.25 ± 2.47	**0.048[b,c]**
T-cytotoxic naïve	$CD3^+$ $CD8^+$ $CD4^-$ $CD45RO^+$	67.69 ± 2.34	59.13 ± 2.58	57.36 ± 2.72	**0.034[b]**
B-cells	$CD3^-$ $CD19^+$	5.17 ± 0.98	8.46 ± 1.08	9.24 ± 1.93	0.087
B-cells memory	$CD3^-$ $CD19^+$ $CD20^+$	34.79 ± 3.27	28.41 ± 3.35	24.23 ± 2.58	0.122
B-cells naïve	$CD3^-$ $CD19^+$ $CD27^+$	61.29 ± 4.75	72.48 ± 2.77	69.70 ± 2.77	0.154
Natural Killer	$CD3^-$ $CD19^-$ $CD16^+$ $CD56^+$	58.28 ± 4.96	26.20 ± 3.07[a]	26.95 ± 4.77[a]	**<0.001[a,b]**
Monocytes	$CD3^-$ $CD19^-$ $CD16^+$ $CD56^-$ $CD14^+$	44.43 ± 16.32	14.97 ± 11.16[a]	38.19 ± 11.99[b]	**<0.001[a,c]**

Data is represented as mean ± SD. ANOVA or Kruskal-Wallis test was performed to assess significant differences between groups (*p*-values are in the table), and for post-hoc analysis Bonferroni or Dunn´s test were used to pair comparations. Significant differences were set at $p \leq 0.05$ and are marked in bold and as follows: [a] Healthy *vs* Early; [b] Healthy *vs* Advanced; [c] Early *vs* Advanced.

Upregulated expressions of *TBX21*, *FOXP3* and *RORC* mRNA in PBMCs of Advanced-stage DM1 group

The expression profiles of *TBX21*, *GATA3*, *FOXP3*, and *RORC*-transcription factors that orchestrate the differentiation of Th1, Th2, Treg, and Th17 cells, respectively- were analyzed in PBMCs. A significant upregulation of *TBX21* mRNA was observed in the Advanced-stage DM1 group compared to Healthy controls (*p*-value: 0.003), whereas *GATA3* expression levels remained unchanged. *FOXP3*, a key regulator of Treg cell development, also showed elevated expression in the Advanced-stage group relative to controls (*p*-value: 0-024). Additionally, *RORC* mRNA expression was increased in the Advanced-stage of DM1 (*p*-value: 0.036) (**Table 3**).

Table 3: Relative expression of different genes associated with immune cell subset in PBMCs from Healthy controls and DM1 patients.

Target gene	Healthy (n=22)	DM1 groups (n=42)		*p*-value
		Early (n=17)	Advanced (n=25)	
Th1				
CCR6	1.22 ± 0.71	0.84 ± 0.15	0.63 ± 0.13	0.521
IFNG	0.86 ± 0.16	1.06 ± 0.25	1.03 ± 0.21	0.865
TBX21	1.16 ± 0.18	1.82 ± 0.26	2.08 ± 0.19	**0.001**[b]
Th2				
CD294	1.16 ± 0.20	5.48 ± 1.48	3.93 ± 0.76	**0.011**[a,b]
GATA3	1.02 ± 0.09	1.00 ± 0.17	0.87 ± 0.05	0.617
Th17				
CXCR3	0.91 ± 0.16	1.41 ± 0.28	1.80 ± 0.24	**0.034**[b]
RORC	1.78 ± 0.39	6.95 ± 2.48	5.30 ± 0.96	**0.017**[b]
T-reg				
CD25	1.17 ± 0.13	3.22 ± 0.50	3.88 ± 0.57	**<0.001**[a,b]
TGFB	0.96 ± 0.08	0.85 ± 0.17	1.15 ± 0.21	0.951
FOXP3	1.01 ± 0.12	1.73 ± 0.38	2.49 ± 0.38	**0.005**[b]
B-cells				
CXCR5	1.05 ± 0.12	5.08 ± 0.84	2.44 ± 0.43	**<0.001**[a,c]
Natural Killer				
CD56	1.00 ± 0.06	0.67 ± 0.12	3.78 ± 0.47	**<0.001**[b,c]
Other cytokines				
IL6	0.94 ± 0.11	0.44 ± 0.13	0.70 ± 0.19	**0.030**[a]
IL10	0.99 ± 0.11	3.04 ± 1.23	2.25 ± 0.52	0.222
TNF	1.22 ± 0.16	2.25 ± 0.49	2.85 ± 0.63	0.305

Data expressed as mean ± SD. ANOVA or Kruskal-Wallis test was performed to assess significant differences between groups (*p*-values are in the table), and for post-hoc analysis Bonferroni or Dunn´s test were used to pair comparations. Significant differences were set at p≤0.05 and are marked in bold and as follows: [a] Healthy vs Early; [b] Healthy vs Advanced; [c] Early vs Advanced.

Inflammatory gene expression profiles during DM1 progression

The composition of immune cell populations in patients with DM1 is modulated by the underlying inflammatory status throughout disease progression. These dynamic changes contribute to shaping the inflammatory responses characteristic of different disease stages.

Quantitative mRNA analysis in PBMCs from DM1 patients revealed that expression levels of key pro-inflammatory genes involved in Th1 cell differentiation, such as *IL1B* and *IL8,* were significantly reduced in the Early-stage group compared to Healthy controls (*p*-values: 0.001 and 0.003 respectively) and upregulated in the Advanced-stages compared to Early-stage group (*p*-values: 0.044 and <0.001). Notable, *IL17* expression was significantly elevated in the Early-stage patients relative to both the Advanced-stage

individuals and Healthy controls (*p*-values: 0.013 and 0.009 respectively) (**Figure 2**). In contrast, *TNF* and *IFNG* mRNA levels exhibit a consisted upregulation trend in both DM1 groups compared to Healthy group, but no statistical significance was found (**Table 3**).

Regarding anti-inflammatory mediators, a significant increase in *ARG1* transcription levels was observed in Early and Advanced-stages compared to Healthy (*p*-value: 0.001 and 0.019 respectively) while in the Early-stage, *HMOX1* undergoes a significant decrease followed by an increased level in Advanced-stage in DM1 patients (*p*-values: 0.001 and <0.001 respectively) (**Figure 2**). Conversely, *IL10* expression did not differ significantly across DM1 stages compared to Healthy individuals (**Table 3**).

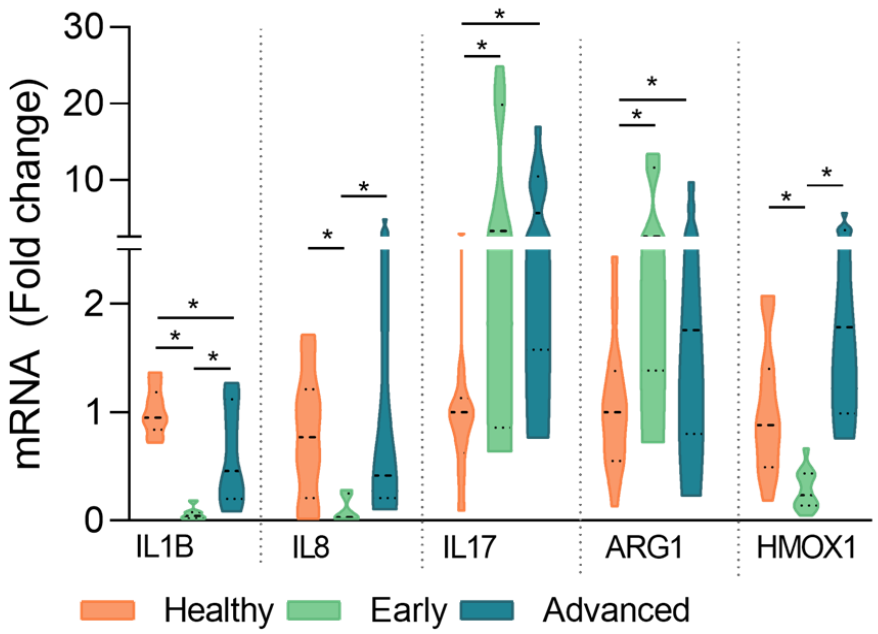


Figure 2: Inflammatory profile of PBMCs during DM1 progression. Violin plots represent the distribution of the relative mRNA expression levels of *ARG1*, *HMOX1*, *IL1B*, *IL8* and *IL17*, quantified by qRT-PCR in PBMCs isolated from individuals in the Early, Advanced or Healthy groups and normalized to *GAPDH* levels (n=15 per group). The pro-inflammatory mRNA cytokines are *IL1B, IL8* and *IL17* and anti-inflammatory mediators are *ARG1* and *HMOX1*. Statistical significance (*p*-value ≤ 0.05) is represented by *. Mean values are indicated by bold lines; dots represent the quartiles.

Correlations between immune cell subpopulations and molecular regulators

Correlation analyses demonstrated significant inverse relationships between *ARG1* and *HMOX1* mRNA expression levels and the proportions of Th17 cells (r = −0.599, *p* = 0.002) and NK cells (r = −0.718, *p* = 0.001), in patients with DM1. Additionally, negative

correlations were observed between Th1 (r = -0.447, $p = 0.010$) and Th2 cells (r = −0.364, $p = 0.048$) and *HMOX1* mRNA transcripts.

Conversely, *HMOX1* mRNA levels exhibited a significant positive correlation with Th17 cell frequencies (r = 0.421, $p = 0.018$). Furthermore, transcript levels of *IL1B* and *IL8* were positively associated with the proportions of naïve $CD4^+$ T cells (r = 0.321, $p = 0.047$), Th17 cells (r = 0.491, $p = 0.004$), and monocytes (r = 0.618, $p = 0.002$) in DM1 patients (**Supplementary Table 3**).

M9 treatment modulates immune responses and cytokine expression profiles

In PBMCs *in vitro* studies from DM1 patients in Early state of disease, we observed anti-inflammatory cytokines (ARG1 and HMOX1) upregulated expression, accompanied of pro-inflammatory cytokines (IL1B and IL6) downregulated expression in presence of M9 treatment (Ortega et al., 2022) (**Figure 3**). As the **Supplementary Figure 1** shown, similar effects were detected in PBMCs from Healthy patients.

LPS stimulation (100 ng/mL) mimics the low-grade inflammatory milieu typically observed during the progression of DM1 (**Supplementary Figure 2**).

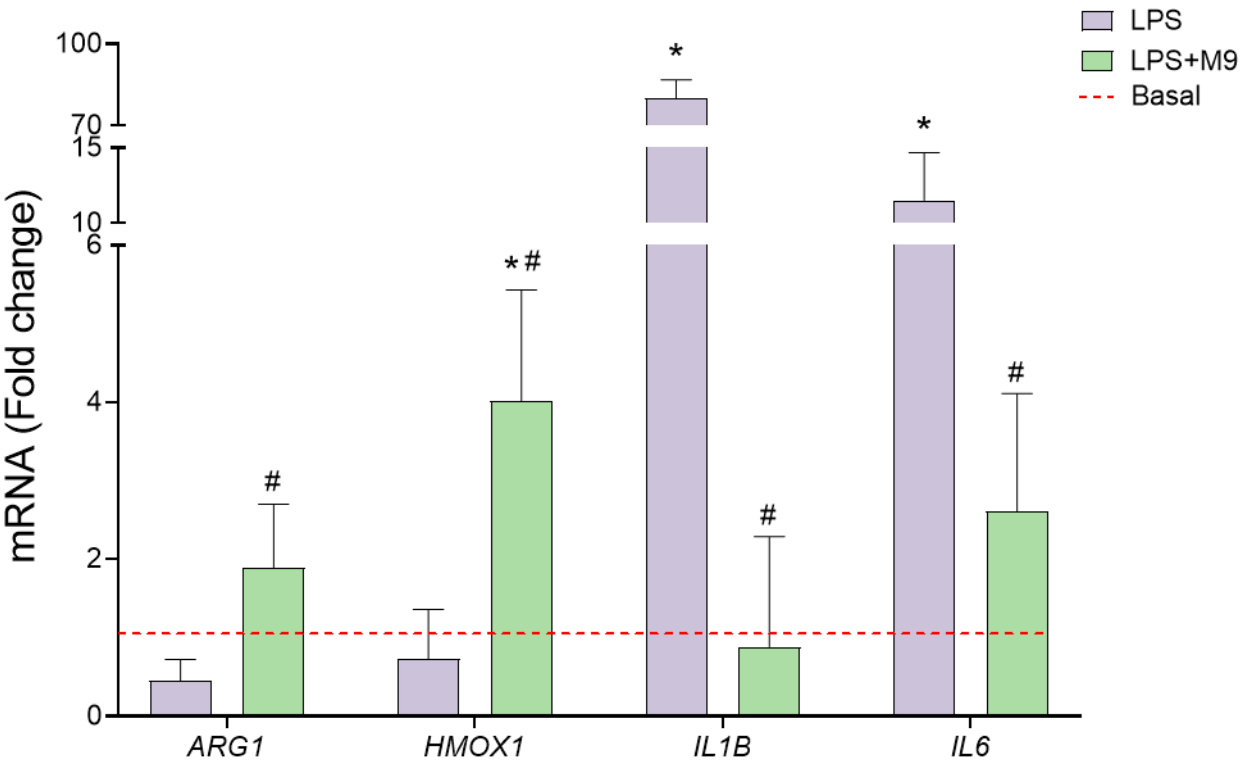


Figure 3: M9 modulated immune responses in PBMCs derived from DM1 patients. PBMCs were cotreated with M9 (20 µM) in the presence of LPS (100 ng/mL) for 24 h. mRNA expression levels of *ARG1*, *HMOX1*, *IL1B* and *IL6* were quantified by qRT-PCR. Gene expression data were normalized to *GAPDH* levels. The red dashed line represents basal expression levels in untreated PBMCs. Results are expressed as fold-change relative

to untreated PBMCs and are mean ± SD (n = 6 patients per group). *$p \leq 0.05$ *vs* Basal $^{\#}p \leq 0.05$ *vs* LPS-treatment. Significant differences were determined by two-way ANOVA followed by Bonferroni *t*-test.

DISCUSSION

In this study, we conducted a comprehensive characterization of the immunological landscape and immune gene expression profiles in peripheral blood from adult patients at various stages of DM1. Our primary objective was to identify immune cell subsets and molecular signatures associated with disease progression and systemic inflammation. Additionally, we evaluated the immunomodulatory potential of novel marine-inspired molecules, analyzing their capacity to mitigate inflammatory responses and thereby influence disease outcomes favorably.

Progressive alterations in immune cell populations observed during the course of DM1 were found to be linked to specific immunopathological mechanisms. Although studies involving adult patients in the Early-stage DM1 are scarce, our data are consistent with findings by Teniente-Serra et al. Flow cytometric profiling revealed stage-dependent shifts in peripheral immune cell composition. Notably, patients with Advanced-stage DM1 exhibited increased frequencies of total $CD4^+$ T cells and memory $CD4^+$ subsets, accompanied by a marked reduction in naïve $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. These patterns suggest sustained immune activation and a shift toward antigen-experienced phenotypes, in line with chronic autoimmune stimulation. The observed decline in naïve $CD8^+$ T cells may reflect progressive exhaustion or peripheral tissue recruitment. Interestingly, Th17 cells frequencies were diminished in Early-stage patients but recovered in Advanced-stage individuals, suggesting a biphasic inflammatory trajectory or the involvement of compensatory regulatory mechanisms. These observations support prior evidence indicating dynamic modulation of Th17 responses across DM1 progression (Teniente-Serra et al., 2021). Conversely, NK cells counts were significantly decreased across both Early and Advanced-stages, potentially indicating impaired cytotoxic function or altered tissue distribution (Luo et al., 2025). Monocyte counts were reduced in Early-stage disease but returned to baseline levels in later stages, potentially reflecting compensatory myelopoiesis or treatment-related effects.

The expression profiles of transcription factors in PBMCs revealed immune polarization and provided insight into functional immune status of patients. Transcriptomic analysis demonstrated increased expression of *FOXP3* in individuals with Advanced-stage disease, indicative of augmented regulatory Treg differentiation pathways (Jaeckel et al.,

2005; Yoon Kim & Kwoon Lee, 2022). Elevated *RORC* mRNA levels were observed in both Early and Advanced-stages, suggesting persistent Th17-related transcriptional activity, despite a decline in circulating Th17 cell counts. No significant alterations were found in *GATA3* expression, implying stable commitment to the Th2 lineage.

Inflammatory cytokine expression exhibited stage-specific patterns. *IL1B* and *IL8* transcripts were downregulated in Early-stage patients, potentially reflecting a transient suppression of pro-inflammatory signaling during initial disease onset. In contrast, *IL8* expression was markedly increased in Advanced-stage patients, consistent with sustained inflammation and ongoing monocyte recruitment (Alhamar et al., 2023). TNF and IFN mRNA levels were upregulated in both disease stages, underscoring their central role in chronic inflammation and β-cell destruction. Moreover, *IL1B* and *IL8* expression positively correlated with naïve $CD4^+$ T cells, Th17 cells, and monocytes frequencies, supporting their involvement in early immune activation and myeloid cell trafficking.

Interestingly, patients exhibited increased expression of the anti-inflammatory gene *ARG1* and *HMOX1*. While *ARG1* upregulation was confined to the Early-stage, *HMOX1* was decreased in Early-stage and elevated in the Advanced-stage of the disease, suggesting a persistent antioxidant and immunoregulatory response aimed at mitigating chronic inflammation (Husseini et al., 2015). Correlation analyses revealed that *ARG1* and *HMOX1* expressions negatively correlated with Th17 and NK cell frequencies, and *HMOX1* expression also showed an inverse relationship with Th1 and Th2 subsets, potentially indicating compensatory mechanisms that restrain pro-inflammatory and cytotoxic responses. Notably, *IL10* expression remained unaltered across disease stages. *IL17* mRNA levels were elevated in Early-stage DM1, potentially reflecting localized Th17 activation or tissue-specific expression not mirrored in peripheral blood.

To investigate a potential therapeutic strategy aimed at halting disease progression and preventing the onset (Díaz-Paredes et al., 2025) of comorbidities, PBMCs isolated from Early-stage DM1 patients were treated *in vitro* with the compound M9. The identification of key molecules involved in the regulation of inflammatory and immunological mechanisms associated with the development of DM1 provides a valuable tool for potential therapeutic strategies. In this context, in recent years, several naturally derived molecules have demonstrated efficacy in modulating the inflammatory response in the diabetic setting. Accordingly, our findings are consistent with those previously reported (Cano-Cano et al., 2021; Díaz-Paredes et al., 2025; Martín-Loro et al., 2024).

This intervention led to a marked upregulation of anti-inflammatory genes (*ARG1, HMOX1*) alongside a significant downregulation of pro-inflammatory cytokines (*IL1B,*

IL6). These findings underscore the therapeutic potential of M9 in restoring immune homeostasis and attenuating the pro-inflammatory environment characteristic of early DM1.

The inflammatory and immunological landscape that drives DM1 progression is shaped by intrinsic disease-related mechanisms as well as systemic modulators that influence whether progression follows an acute or gradual course. Within this context, the development and application of novel immunoregulatory bioactive molecules represent a promising avenue for long-term migration of disease-associated inflammation, ultimately enhancing both prognosis and clinical management through targeted modulating of immune signatures.

STUDY LIMITATIONS

This study has several limitations that should be considered. First the use of PBMCs may not fully capture the immune processes that occurs in the organism during DM1 development. Second, individual variability among DM1 patients and Healthy donors may introduce heterogeneity that could influence the observed data. Third, the culture of PBMCs using M9 and LPS is a simplified experimental system that does not reflects the *in vivo* immune environment. For all of this more studies are necessary and the addition of more subjects in the study to improve the statistical power of this assay.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary table 1: Cell surface staining antibodies.

Target	Clone	Fluorochrome	Manufacturer	Catalogue #
CD3	UCHT1	FITC	BD pharmingen	561806
CD14	M5E2	BV650	Biolegend	301836
CD16	3G8	PE-CF594	BD Horizon	562320
CD19	HIB19	APC	BD pharmingen	555415
CD20	2H7	Pacific Blue	Biolegend	302319
CD27	M-T271	PE	BD pharmingen	560985
CD56	B159	PE-Cy5	BD pharmingen	561904
CD3	UCHT1	V450	BD Horizon	560366
CD4	RPA-T4	APC-Cy7	BD pharmingen	561839
CD8	SK1	FITC	BD pharmingen	345772
CXCR3 (CD183)	1C6	PE-Cy5	BD pharmingen	561731
CD294 (CRTH2)	BM16	PE	Biolegend	350105
CD45RA	HI100	BV650	BD Horizon	563963
CD45RO	UCHL1	PerCP-Cy5.5	BD pharmingen	560607
CCR6	11A9	PE-CF594	BD Horizon	564816
CD14	MϕP9	BV510	BD Horizon	563079
CD16	3G8	BV711	BD Horizon	563127
CD25	M-A251	APC	BD pharmingen	561399
CD40	5C3	PE-Cy7	BD pharmingen	561215
CD80	2D10.4	BV421	BD OptiBuild	751723
CD86	BU63	RY586	BD OptiBuild	753199
HLA-DR	G46-6	BB515	BD Horizon	564516

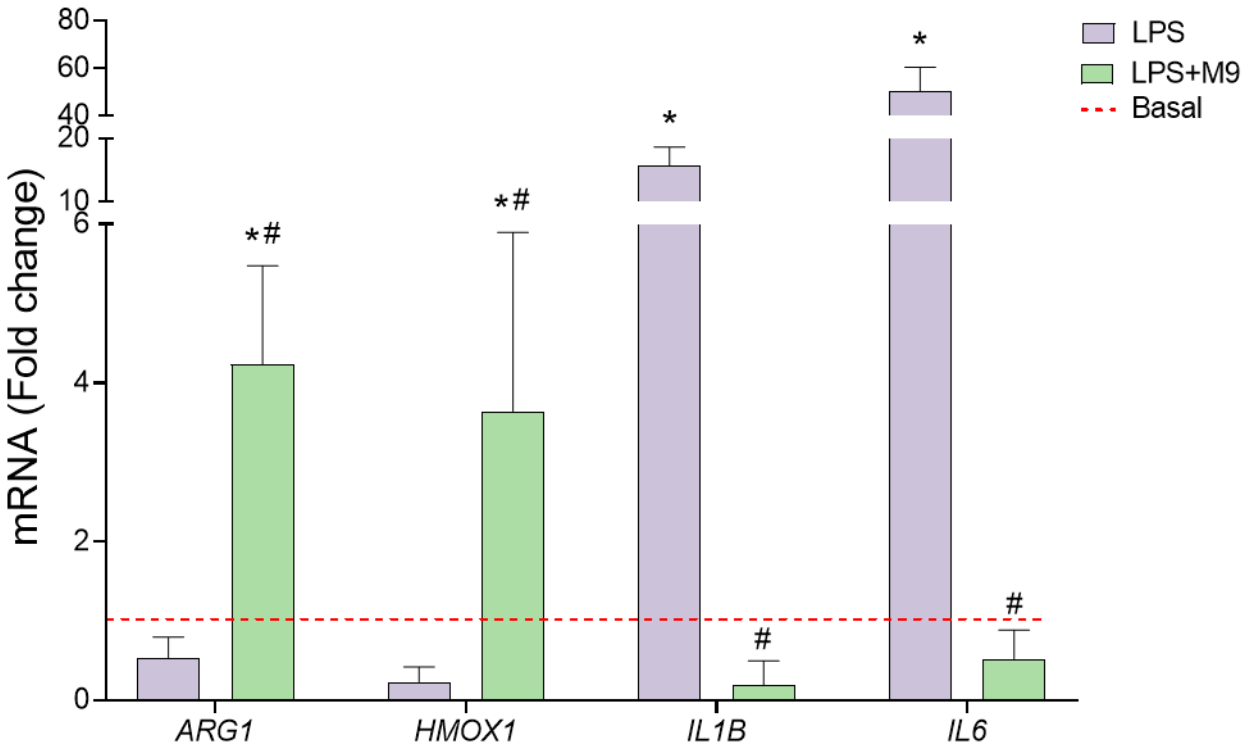
Supplementary table 2: Primer-probe test

Gene	Forward primer (5´-3´)	Reverse primer (5´-3´)
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
IL1B	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG
IL6	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
IL8	AAGAGAGCTCTGTCTGGACC	GATATTCTCTTGGCCCTTGG
IL10	CTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTC	ATTCTTCACCTGCTCCACGGCCTT
IL17A	TGTCCACCATGTGGCCTAAGAG	GTCCGAAATGAGGCTGTCTTTGA
CXCR3	ACGAGAGTGACTCGTGCTGTAC	GCAGAAAGAGGAGGCTGTAGAG
CXCR5	TGAAGTTCCGCAGTGACCTGTC	GAGGTGGCATTCTCTGACTCAG
CCR6	CTGAACCCTGTGCTCTACGCTT	CACAGGAGAAGCCTGAGGACTT
IFNG	TCGGTAACTGACTTGAATG	ATTACTGGGATGCTCTTC
TNFA	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG	ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC
HMOX1	GAGTGTAAGGACCCATCGGA	GCCAGCAACAAAGTGCAAG
ARG1	CTACAAAACAGGGCTACTCTCAGGAT	GTTCGAGTTACTTCTTCTGGTGTCTTC
TGFB	AGCGACTCGCCAGAGTGGTTA	GCAGTGTGTTATCCCTGCTGTCA
CD25	ACCCTGAATTTGGCCTGCACTA	GACCTCCATCCCTTCTCCCTCT
CD56	CATCACCTGGAGGACTTCTACC	CCAAGGACTCCTGCCCAATG
CD294	CCTCTGTGCCCAGAGCCCCACGATGTCGGC	CACGGCCAAGAAGTAGGTGAAGAAG
FOXP3	CTGACCAAGGCTTCATCTGTG	ACTCTGGGAATGTGCTGTTTC
GATA3	AAGGCATCCAGACCAGAAACCG	AGCATCGAGCAGGGCTCTAACC
RORG	CCTGGGCTCCTCGCCTGACC	TCTCTCTGCCCTCAGCCTTGCC
Tbx21	CAAGCAGGGACGGCGGATGT	TTGGACGCCCCCTTGTTGTTTG

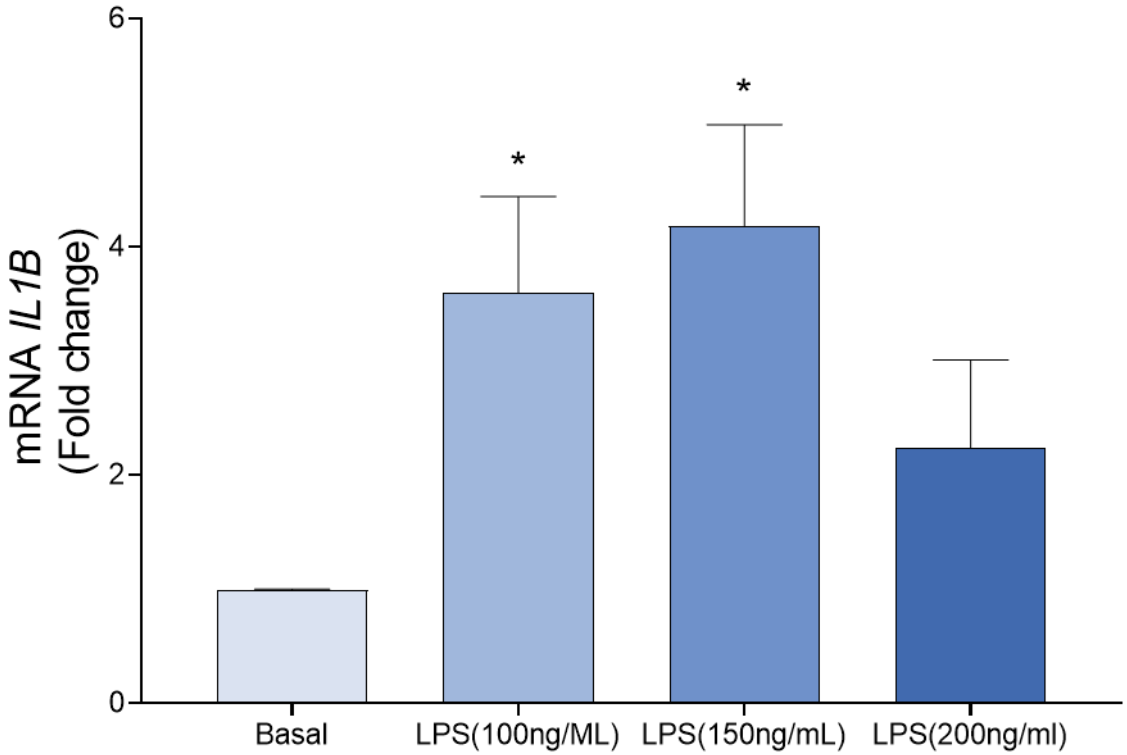
Supplementary table 3: Spearman´s rank correlation coefficients among the variables

Correlations			
Inflammatory mediators	**Cell subpopulations**	**Spearman´s Rho (ρ)**	***p-value***
ARG1	T-cell Th17	-0.599	**0.002**
ARG1	NK	-0.718	**0.001**
HMOX1	T-cell Th1	-0.447	**0.010**
HMOX1	T-cell Th2	-0.364	**0.048**
HMOX1	T-cell Th17	0.421	**0.018**
IL1B	T-cell naïve $CD4^+$	0.321	**0.047**
IL1B	T-cell Th17	0.491	**0.004**
IL1B	Monocytes	0.618	**0.002**
IL8	Monocytes	0.768	**<0.001**

The correlation coefficient was calculated using Spearman´s rank correlation (ρ). p-values ≤ 0.05 was considered statistically significant and are highlighted in bold.



Supplementary Figure 1: M9 induces immunomodulation in PBMCs from healthy donors. PBMCs were pretreated with M9 (20 µM) in presence of LPS (100 ng/mL) for 24 h. Quantification of *ARG1*, *HMOX1*, *IL1B* and *IL6* mRNA levels determined by qRT-PCR. Data were normalized to *GAPDH* gene expression. The red, the dashed red line indicates the basal values from PBMCs cultivated but not treated. Results are expressed as mean ± SD (n = 5 independent experiments) and presented as fold-change values relative to untreated control PBMCs (basal value). *$p \leq 0.05$ *vs* basal treatment, $^{\#}p \leq 0.05$ *vs* LPS treatment.



Supplementary Figure 2: PBMCs stimulation by LPS. PBMCs were pretreated with LPS (100 ng/mL) for 24 h. Quantification of *IL1B* mRNA levels determined by qRT-PCR. Data were normalized to *GAPDH* gene expression. Results are expressed as mean ± SD (n = 5 independent experiments) and presented as fold-change values relative to untreated control PBMCs (basal value). *$p \leq 0.05$ *vs* basal treatment.

5.2 Estudio II

Perfil dinámico de citoquinas en pacientes de Diabetes Mellitus tipo 1 desde su inicio hasta estadios avanzados: Su potencial participación en el desarrollo de retinopatía diabética.

RESUMEN

La DM1 es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de una inflamación crónica, esto contribuye al desarrollo de complicaciones como la RD. Para estudiar la progresión que tiene la DM1, en este estudio se incluyeron pacientes diagnosticados con la enfermedad según las directrices de la asociación Americana de diabetes, pero divididos en 4 grupos según la duración de la diabetes: el grupo A lo conforman aquellos que llevaban menos de 3 meses desde que se les diagnosticó, el grupo B lo conforman pacientes que llevan entre 3 meses 1 un año con la enfermedad diagnosticada, el grupo C son aquellos que lo llevan padeciendo entre uno y cinco años y por último el grupo D que son aquellos que llevan más de 5 años con la DM1 diagnosticada. En total 74 pacientes diagnosticados con la DM1 junto con 23 voluntarios sanos (grupo H) con similares características etno-demográficas fueron seleccionados para los ensayos.

De todos los participantes se obtuvieron muestras de suero para poder analizar los niveles de citoquinas pro e antiinflamatorias, además de otros parámetros bioquímicos (Colesterol, glucosa…). Además, se realizaron estudios de imagen a nivel de la retina mediante el uso de OCT de los grupos H, C y D para la realización de medidas del grosor de la retina y detectar en caso de que lo hubiese, rastros de desarrollo de RD.

Los resultados del estudio mostraron la presencia de elevados niveles de varias citoquinas proinflamatorias (IL-1β, TNF-α, IL-18, IL-12Ra, IL-8, MCP-1, MIF, IP10 y M-CSF) en la etapa inicial de la enfermedad (A) al compararla con el grupo sano (H). En el grupo C presenta niveles elevados de varias citoquinas proinflamatorias (Eotaxina, IL-8, IL-2Ra, MCP-1, MIG, IL-12(p70) e IL-17), pero también es el único grupo que presenta elevados niveles de citoquinas antiinflamatorias (IL-4 y LIF) al compáralo con el grupo H. Se detectó correlación entre el perfil de las citoquinas proinflamatorias y el inicio de la RD como la reducción del grosor de la retina y aumentos en el área de la zona avascular foveal (FAZ) y de la neovascularización en los grupos C y D.

Los perfiles específicos de citoquinas pro y antiinflamatorias que hemos podido observar

en la progresión de la DM1, podrían ser utilizados como biomarcadores relacionados con la respuesta inmune, mejorando de esta forma la diagnosis y la prognosis además de poder potencialmente ayudar en la prevención y el manejo de la DM1 y sus complicaciones asociadas como la RD.

Dynamic cytokine profiles from onset to advanced-stages in Type 1 Diabetes Mellitus patients: a potential involvement with 1 Diabetic Retinopathy development

ABSTRACT

DM1 is an autoimmune disease characterized by the destruction of insulin producing beta cells, now a day DM1 represents approximately 2% of all the diabetic population. For those individuals glycemic control using exogenous insulin administrations is the most frequent treatment but there is evidence of the role of innate inflammation in the development of secondary complications such as RD which is one of the leading causes of blindness in working-age adults. In RD hyperglycemia and inflammation causes the degeneration of the blood retinal barrier and the recruitment and activation of the immune cell, causing a proinflammatory environment in the retina.

Our aim is determining the inflammatory profiles linked to DM1 progression and RD development.

Enrolled patients were categorized into four groups based on the duration of the disease: <3 months (group A), ≥3 months to ≤1 year (group B), ≥1 to <5 years (group C) ≥5 years (group D) and one group of healthy individuals (group H). Venous blood samples were collected for cytokine analysis, alongside standard biochemical analysis for all the groups. Ophthalmologic evaluations were conducted on all patients in groups H, C and D.

The data obtained revealed that IL-1β,TNF-α, IL2-Ra, IL-8 and MCP-1, levels were significantly elevated in group A compared to group H. IL-8, IL2-R and MCP-1 and MIG maintained increased levels in group C. Still, Eotaxin, IL-12(p70) and IL-17 presented elevated levels only in group C, in the same way that IL-4 and LIF as anti-inflammatory cytokines compared to group H. A correlation was observed between the pro-inflammatory cytokine profile and the onset of RD, with initial indicators: retinal thickness reduction and neovascularization area increased in groups C and D.

The specific cytokine profile in DM1 progression may act as biomarker, enhancing diagnosis, prognosis, and prevention of complications like RD, while offering therapeutic potential through targeted disease-specific pathways.

MATERIAL AND METHODS

Study participants

Seventy-four patients diagnosed with DM1 according to American Diabetes Association (Care., 2021) were recruited from the Endocrinology and Nutrition Department of University Hospital Puerta del Mar in Cádiz. Patients were enrolled in this study based on the following criteria: 1) continuous insulin treatment since onset, 2) good glycemic control, 3) non-related chronic infectious diseases or 4) other autoimmune/inflammatory pathologies. HbA1c and/or degree of glycemic control (GMI) less than or equal to 7% and a coefficient of variability of blood
glucose levels (%CV) less than or equal to 36 % shall be accepted as objectives for good control of DM1 (Battelino et al., 2019). In addition, twenty-three volunteers from the same area and ethnicity as patients, with no history of chronic infectious or major illnesses (similar to those described for DM1 patients), nor any immunological alterations, were included as Healthy control group (H).

To study disease progression, enrolled patients were categorized into four groups based on the duration of the disease since onset: ≤3 months (group A), >3 to ≤12months (group B), >12 months to ≤5 years (group C) and >5 years (group D). The ophthalmologic analysis was done in all patients from groups C and D. In this study the patients from C group with RD detection were determined as early RD patients, while the patients with RD in D group were determined as advanced RD. The presence of RD was evaluated following the criteria and scales from the *International Council of Ophthalmology* (Wong., et al 2018).

Ethics

This study was approved by the institutional Research Ethics Committee of the province of Cádiz (registration number 05.23). All subjects or their tutors gave written informed consents following the Declaration of Helsinki. All data were pseudo-anonymized to preclude patient/donor identification and were included in a database to which only the researchers had access.

Serum cytokine analysis

A routine biochemical blood analysis was conducted on all participants, and blood samples were collected to extract serum for cytokine biomarker analysis. Samples were

obtained after a minimum of 8 hours of fasting period. Clot-activating tubes were utilized for serum separation, allowed to clot at room temperature for at least 30 minutes, and subsequently centrifuged at 1500g for 10 minutes. The resulting serum was then aliquoted and stored at -80ºC until cytokine analysis. From each group, a random subset of 15 participants was selected for analysis.

Cytokine analysis was performed using Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 48-plex Assay (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) to evaluate cytokine concentration of the following cytokines: basic-FGF, Eotaxin, G-CSF, M CSF, GM-CSF, CXCL1, HGF, IFN-γ, IFN-α2, IL-1β, IL-1ra, IL-1α, IL-2Rα, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL 10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-18, LIF, IP-10, MCP-1, MCP-3, MIG, β-NGF, SCF, SCGF β, SDF-1α, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, TNF-α, TNF-β, CTACK, MIF, TRAIL, and VEGF. The analysis followed the manufacturer's instructions and recommendations. All measurements were conducted using Luminex technology FLEXMAP 3D® equipment (Luminex Corporation, TX, USA) and each sample was assessed in duplicate for accuracy.

SD-OCT evaluation

The images were captured by expert personnel from the Ophthalmology Department at Puerta del Mar University Hospital in Cádiz, who routinely perform this work. All scans were conducted by a qualified operator and subsequently reviewed to ensure proper signal strength, centering, beam placement, and 136 targeting. Retinography, OCT and OCTA images were obtained by DRI OCT Triton (Topcon Medical Systems, 137 Inc, Oakland, NJ, USA), a spectral-domain OCT using custom 6x6 mm acquisition protocol centered in the fovea. OCTA parameters were automatically computed by IMAGEnet 6 software (version 1.17.9720; Topcon Medical Systems, Inc, Oakland, NJ, USA). The area of the FAZ was manually outlined in the superficial capillary plexus (SCP) using the caliper area tool in IMAGEnet 6 and was expressed in square millimetres (mm2). Vessel density for both SCP and deep capillary plexus (3 × 3 mm OCT-A images) was measured using the automatic software algorithm with the segmentation process detailed by Stanga et al., 2016.

Based on previous reports (Vujosevic et al., 2017; Zhu et al., 2022), hyperreflective foci (HRF) were defined as discrete and dotted signals in the retina with clear boundaries. Their reflective signals were defined as higher than or equal to those of the Retinal Pigment Epithelium (RPE) to exclude signal noise. The HRF were identified within the

retinal layers.

Statistics

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Prism version 9 for Windows 5.03). Initially, the normality distribution of every set of data was established using the Kolmogorov-Smirnov test. Subsequently, one-way ANOVA for multiple groups of data was performed by the ANOVA *F*-test (normal distribution) or by the Kruskal-Wallis test (no normal distribution). For comparisons of two groups of data, Student's *t*-test (for normally distributed data) or the Mann-Whitney *U*-test (for no normally distributed data) was used. Bivariate correlations between SD-OCT parameters and cytokines were performed using Spearman´s rank correlation coefficient (no normal distribution). The chi-square test was used to test relationships between categorical variables. The results are expressed as the mean and SD. A significance level of $p \leq 0.05$ was adopted for all tests. Excluded data are from those that did not reach minimal detectable values to be included in a curve analysis and those considered extreme outliers (3.5 times above or below the mean value). receiver operating characteristic (ROC) curve analysis evaluated the predictive value of serum cytokines for the prognosis RD in DM1 patients. A *p*-value ≤0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Characteristics of the study population

The sociodemographic and clinical data of the different groups are shown in **Table 1**. The H group present differences with all diabetic groups in basal glucose (H *vs* A, $p = 0.001$; H vs B, $p = 0.026$; H *vs* C, $p = <0.001$; H *vs* D, $p = <0.001$), C-peptide (H *vs* A, $p = <0.001$; H vs B, $p = 0.019$; H *vs* C, $p = 0.001$; H *vs* D, $p = <0.001$), A1c (H *vs* A, $p = <0.001$; H vs B, $p = 0.002$; H *vs* C, $p = 0.003$; H *vs* D, $p = <0.001$) and HbA1c (H *vs* A, $p = <0.001$; H vs B, $p = 0.005$; H *vs* C, $p = 0.006$; H *vs* D, $p = <0.001$). Group A, the recently diagnosed patients, exhibited significant differences in A1c levels compared to B and C groups ($p = 0.004$, $p = 0.023$ respectively). Group D, the one with more years of disease evolution, showed a significant difference in age with the H, A and B groups *(*$p = 0.031$, $p = <0.001$, $p = 0.001$, respectively), in insulin dose with A, B and C groups ($p = <0.001$, $p = <0.001$, $p = 0.016$ respectively), in lymphocyte count with H group ($p = 0.005$) and %CV with A and B groups ($p = 0.018$, $p = 0.049$ respectively). Regarding ophthalmological data, a significant difference was found between the macular retinal

fiber layer (mRNFL) thickness in H group *vs* D group ($p = 0.014$), angiography and FAZ between C and D groups ($p = 0.002$, $p = <0.001$ respectively).

Table 1: Study population profile: Demographic, biochemical, cellular and ophthalmic data.

Variable	*Group H* (n=23)	DM1 Groups				*p*-value
		Group A (n=20)	Group B (n=14)	Group C (n=10)	Group D (n=30)	
Demographic parameters						
Age (years)	30.17 ± 8.48	27.72 ± 12.42	28.06 ± 12.11	37.13 ± 12.16	40.96 ± 11.52[a,b,c]	**<0.001**
Gender F/M	14/09	08/12	05/09	04/06	11/19	-
Biochemical parameters						
Basal glucose (mg/dL)	90.95 ± 6.81[b,c,d,e]	157.77 ± 78.63	137.00 ± 54.33	185.42 ± 57.60	148.85 ± 81.24	**<0.001**
Insulin dose (UI)	-	27.88 ± 12.32	28.61 ± 11.20	35.36 ± 18.70	54.71 ± 23.10[b,c,d]	**0.008**
C-peptide (ng/mL)	1.91 ± 1.22[b,c,d,e]	0.63 ± 0.34	0.82 ± 0.57	0.60 ± 0.56	0.05 ± 0.17	**<0.001**
ACRU (mg/g)	5.00 ± 1.09	15.27 ± 19.30	5.51 ± 3.15	11.49 ± 13,15	28.08 ± 82,57	0.157
A1c (mmol/mol)	27.86 ± 6.93[b,c,d,e]	84.22 ± 29.98[c,d,e]	50.52 ± 12.42	50.92 ± 9.99	60.27 ± 14.05	**<0.001**
HbA1c (DCCT%)	5.00 ± 1.04[b,c,d,e]	9.61 ± 2.91	6.91 ± 1.22	6.80 ± 0.91	7.63 ± 1.34	**<0.001**
CV (%)	-	27.63 ± 3.03	30.96 ± 13.07	33.93 ± 7.75	39.25 ± 8.65[b,c]	**0.016**
GMI (mmol/mol)	-	47.85 ± 7.01	49.75 ± 9.20	53.01 ± 9.66	58.16 ± 11.85	**0.025**
Cellular data						
Neutrophil ($x10^3/\mu L$)	3.78 ± 1.44	2.64 ± 1.07	3.67 ± 0.70	3.47 ± 1.38	3.90 ± 1.57	0.336
Lymphocyte ($x10^3/\mu L$)	1.91 ± 0.65	2.23 ± 0.35	2.63 ± 1.06	1.84 ± 0.61	2.50 ± 0.75[a]	**0.004**
Monocyte ($x10^3/\mu L$)	0.51 ± 0.18	0.51 ± 0.12	0.53 ± 0.19	0.42 ± 0.11	0.60 ± 0,24	0.064
Eosinophil ($x10^3/\mu L$)	0.20 ± 0.15	0.13 ± 0.05	0.21 ± 0.09	0.27 ± 0.25	0.28 ± 0.20	0.083
Basophil ($x10^3/\mu L$)	0.04 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.060
Ophthalmic parameters						
mRNFL (µm)	300.82 ± 11.36	-	-	288.03 ± 25.21	285.36 ± 20.66[a]	**0.006**
OCTA (mm^{-1})	-	-	-	161.45 ± 54.89	296.48 ± 144.43[b]	**0.002**
FAZ (μm^3)	-	-	-	43.11 ± 2.49	40.59 ± 2.00[b]	**<0.001**

F/M: female/male, ACRU: Albumin to creatinine ratios urine, HbA1c: Glycated hemoglobin levels, GMI: Glucose management indicator, mRNFL: Macular retinal nuclear fiber layer, FAZ: Foveal avascular zone. Data are shown as mean ± SD. [a] $p \leq 0.05$ *vs* goup H, [b] $p \leq 0.05$ *vs* goup A, [c] $p \leq 0.05$ *vs* goup B, [d] $p \leq 0.05$ *vs* goup C, [e] $p \leq 0.05$ *vs* goup D.

Analysis of serum cytokines

The chronic inflammatory environment associated with DM1 has been extensively described and is closely linked to the development of specific complications, such as RD.

To explore the potential association between serum cytokine levels and DM1 progression, we investigated the cytokine profiles present at various stages of the disease. Cytokines exhibit highly pleiotropic and redundant functions with some being secreted by multiple immune cell populations (Matejuk et al., 2021). Although cytokines classification is challenging, we categorized the analyzed cytokines into four main groups: Pro-inflammatory, anti-inflammatory, chemokines and growth factors. However, they could be further classified into different groups based on alternative criteria.

a) Pro-inflammatory cytokines

Serum levels of pro-inflammatory cytokines were significantly modulated in DM1 patients compared with group H and, distinct cytokine patterns were observed across disease stages (**Figure 1A**). Specifically, IL-1β was notably elevated in group A relative to group H ($p = 0.028$), and TNF-α was elevated in group A compared to all the studied groups (groups A *vs* H, $p = 0.097$; A *vs* B, $p = <0.001$; A *vs* C, $p = 0.005$; A *vs* D, $p = 0.014$). Moreover, groups A, C and D showed significantly increased levels of IL-8 ($p = 0.009$, $p = 0.002$, $p = 0.014$, respectively) and IL-2Ra ($p = 0.016$, $p = <0.001$, $p = <0.001$, respectively) when compared with H group, while group B showed similar levels to H, but differed significantly from the remaining DM1 groups in the case of IL-8 (B *vs* A, $p = 0.028$; B *vs* C, $p = 0.007$; B *vs* D, $p = 0.041$). The IL-17 displayed a specific increase only in group C compared with groups H and A ($p = 0.026$, $p = 0.008$, respectively).

Conversely, TNF-β levels were significantly decreased in all DM1 groups compared with controls (groups H *vs* A, $p = 0.006$; H *vs* B, $p = 0.008$; H *vs* C, $p = 0.0047$; H *vs* D, $p = 0.035$) and also, IL-16 decreased in group D compared with groups H, A and B ($p = 0.022$; $p = 0.027$; $p = <0.001$, respectively) and also in group C there is a decrease compare to B group ($p = 0.032$), while IL-12 (p70) increased significantly in groups C and D compared with H and B (C *vs* H, $p = 0.024$; C *vs* B, $p = 0.022$; D *vs* H, $p = 0.049$; D *vs* B, $p = 0.046$; **Supplementary Table 1**). IL-18 fold changes were elevated in groups A, B and D ($p = 0.036$, $p = 0.019$, $p = 0.024$, respectively) with no significant changes in C group compared to H. Altogether, a large number of pro-inflammatory cytokines were up-regulated from the earliest stages of DM1, whereas group C showed a relative decline in the number of elevated pro-inflammatory mediators.

b) Anti-inflammatory cytokines

The analysis of the anti-inflammatory cytokines revealed a consistent increase in IL-1ra (H *vs* A, $p = 0.002$; H *vs* B, $p = 0.018$; H *vs* C, $p = 0.042$; H *vs* D, $p = 0.046$) and IL-13

(H *vs* A, p = 0.004; H *vs* B, p = 0.034; H *vs* C, p = 0.020; H *vs* D, p = 0.036) levels throughout DM1 progression compared with group H (**Figure 1B**). In addition, significantly higher concentrations of IL-4 and LIF were detected in group C compared with group H (p = 0.010; p = 0.006 respectively). Also, C group present higher levels of IL4 (C *vs* A, p = 0.006) and LIF (C *vs* A, p = 0.042; C *vs* B, p =0.010; C *vs* D, p = 0.018) compare to other DM1. Conversely, IL-9 levels were significantly decreased in all DM1 groups relative to group H (H *vs* A, p = 0.021; H *vs* B, p = 0.006; H *vs* C, p = 0.036; H *vs* D, p = 0.037). Overall, a broader number of anti-inflammatory cytokines showed increased expression in group C, suggesting an enhanced compensatory response during the middle stages of DM1 progression.

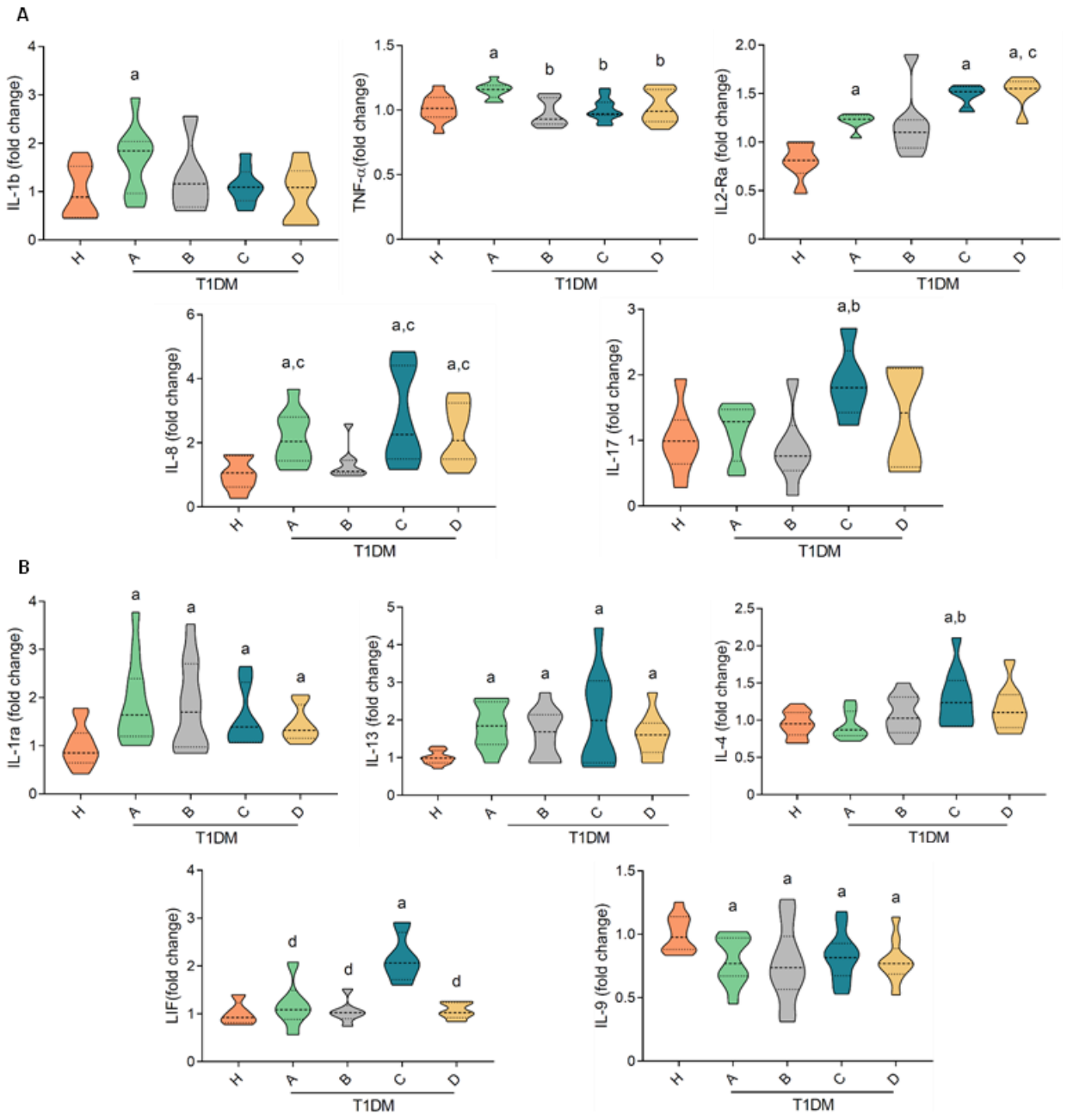


Figure 1: Levels of pro (A) and anti-inflammatory (B) cytokines in serum from peripheral blood were assayed in patients diagnosed with DM1, stratified into 4 groups: ≤3 months (group A), >3 to ≤12 months (group B), >12 months to ≤5 years (group C) and >5 years (group D) from the onset as well as in healthy controls (H). All cytokines were assayed by the Bio-Plex assay. [a]$p \leq 0.05$ *vs* H; [b]$p \leq 0.05$ *vs* A; [c]$p \leq 0.05$ *vs* B; [d]$p \leq 0.05$ *vs* C; [e]$p \leq 0.05$ *vs* D.

c) Chemokines

The analysis of chemokines fold change patterns included MCP-1, IP-10, Eotaxin, MIF, MIG, CXCL1 and MIP-1b (**Supplementary Table 1**). MCP-1 exhibited a sustained increase from group A to group D compared with group H (groups H *vs* A, $p = 0.005$; H *vs* B, $p = <0.001$; H *vs* C, $p = 0.001$; H *vs* D, $p = 0.006$). Similarly, MIF and IP-10 levels were elevated in several patient groups when compared with H group, reaching statistical significance in groups A ($p = 0.025$; $p = 0.009$, respectively) and B ($p = 0.023$; $p = 0.003$, respectively), corresponding to the early stages of DM1 progression. Higher levels were also observed in MIG and Eotaxin levels, with significant differences in groups B and C ($p = 0.020$; $p = 0.038$) or just in group C ($p = 0.015$) compared to healthy group H, respectively.

In contrast, decreased levels in groups B, C and D were found in CXCL1 ($p = 0.039$; $p = 0.011$, $p = <0.001$) and MIP-1β ($p = <0.001$; $p = 0.037$, $p = 0.007$, respectively) when comparing with controls.

The chemokines profile revealed a marked upregulation at DM1 onset, followed by a partial attenuation in intermediate stages suggesting dynamic modulation of inflammatory signaling throughout disease progression

d) Growth factors

After assessing the chemokine profile, the study examined several growth factors such as HGF and SCF showing no discernible differences in their levels between the studied groups. However, the analysis of other factors such as M-CSF and G-CSF revealed a slightly increase in all groups compared to the control group, but only reaching statistically significant in groups A and D, in the case of M-CSF, and only for group C in the case of G-CSF ($p = 0.010$; **Supplementary Table 1**).

Retinal affectation and identification of hyperreflective foci in late stages of DM1

The global average perifoveal mRNFL thickness (mean ± S.D) was significantly lower in the group D compared to the group H (285.36 ± 20.66 *vs* 300.82 ± 11.36; p = 0.013). The Foveal Avascular Zone (FAZ) (mean ± S.D) was significantly lower in the group C compared to the group D (161.45± 54.89 *vs*. 296.48 ± 144.43; p <0.05). And the Optical Coherence Tomography (OCT)-angiography presented a significantly lower area in group D compared to the group C (43.11± 2.49 *vs*. 40.59 ± 2.00; p <0.05).

Associated with the inflammatory environment, HRFs were identified in groups C and D, located mainly in the inner retinal layers (**Figure 2**). Associated with DM1 progression, the detection of a higher number of HRF in the inner and outer retinal layers is located in retinas from groups C or D with previous RD diagnostic (**Figure 2 C-D**). The progression of DM1 and the presence of RD is associated with a higher presence of HRF compared to a similar time-point and absence of RD.

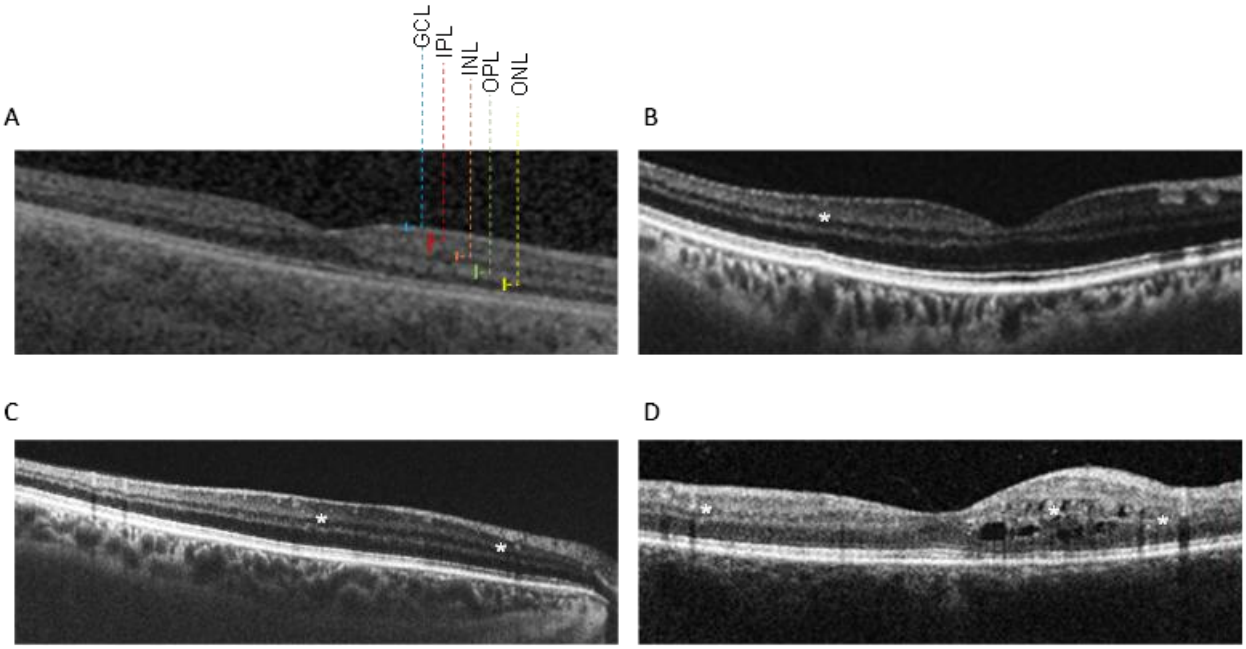


Figure 2: Representative Spectral Domain Optical Coherence Tomography (SD-OCT) images showing the progression of RD in C and D groups with HRF. **A**) Healthy control; **B**) C group (>12 months to ≤5 years from diagnostic) without RD; **C**) C group (>12 months to ≤5 years from diagnostic) with RD; **D**) D group (>5 years from diagnostic) with RD. The HRFs are indicated by white stars. Blue line: GCL-Ganglion Cell Layer; Red line: IPL-Inner Plexiform Layer; Orange Line: INL-Inner Nuclear Layer; Green Line: OPL-Outer Plexiform Layer; Yellow line: ONL-Outer Nuclear Layer.

Correlations between retinal parameters and cytokines patterns

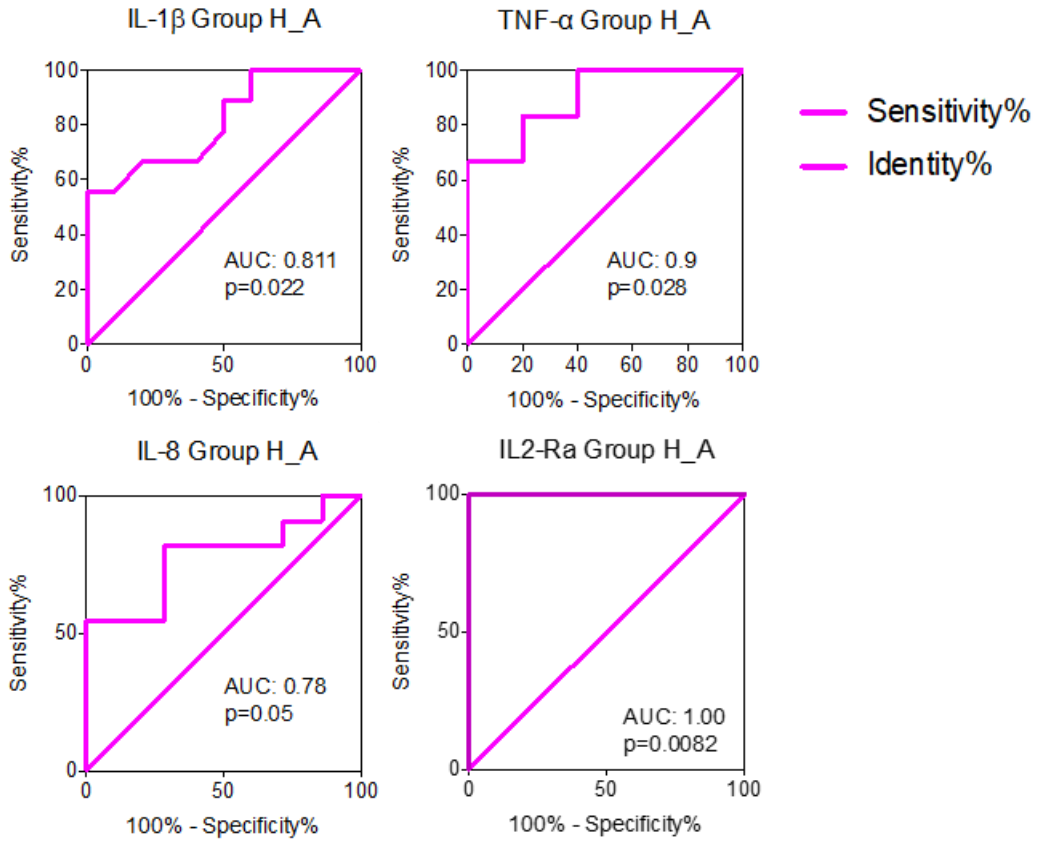
The retinal analysis performed under clinical specifications in DM1 patients from groups C and D showed correlations between retinal parameters and biochemical data (**Supplementary Table 2**). In group C, mRNFL thickness correlated positively with IL-8 (r = 0.928, $p = 0.008$) and negatively with IL-17 (r = -0.900, $p = 0.037$).

In the case of group D, negative correlations were found between mRNFL thickness and IL-2Ra levels (r = -0.890, $p = 0.039$) and also, between OCTA *vs* TNF-α and OCTA *vs* MIP (r = -0.670, $p = 0.048$; r = -0.722, $p = 0.028$, respectively). Furthermore, positively correlations were found in group D between OCTA and IL1-Ra (r = 0.880, $p = 0.021$).

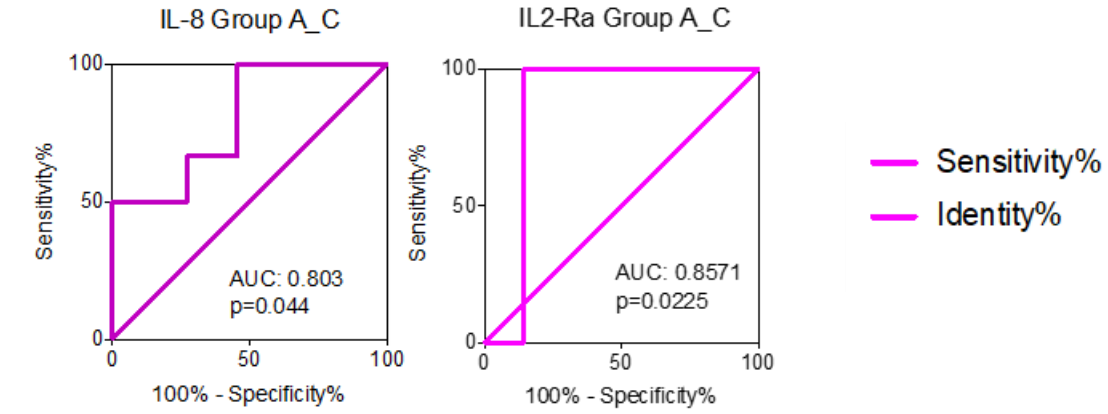
The predictive value of serum IL-8 and IL-2Ra in the onset of DM1 reveals the prognosis of retinal alterations

To evaluate the diagnostic efficacy, ROC curves were constructed utilizing both the training and validation sets (**Supplementary Table 3**). In data obtained from the cohort, the area under the curve (AUC) of the biomarkers were IL-1β (0.811, 95% CI: 0.6137-1.009), TNF-α (0.9, 95% CI: 0.7133-1.087), IL-8 (0.7792, 95% CI: 0.5617-0.9968) and IL-2Ra (1.00, 95% CI: 1.00-1.00) (**Figure 3A**) in Group A. The AUC for predicting the presence of two biomarkers of them in the C group of DM1 patients were IL-8 (0.803, 95% CI:0.5831-1.023) and IL2-Ra (0.857, 95% CI: 0.5979-1.116) (**Figure 3B**). And the prediction of the prognosis of retinal complications since DM1 patients Group A by the presence of IL-17 as a biomarker involved in RD development in Group C were IL-8 (0.7692, 95% CI:0.5594-0.9791) and IL-2Ra (1.00, 95% CI:1.00-1.00) (**Figure 3C).** These findings showed that the identified that both biomarkers have a good diagnostic value since A group, in differentiating between the prognosis of retinal complications detected in the C group.

A


IL-1β Group H_A
TNF-α Group H_A
IL-8 Group H_A
IL2-Ra Group H_A
Sensitivity%
100% - Specificity%
AUC: 0.811
p=0.022
AUC: 0.9
p=0.028
AUC: 0.78
p=0.05
AUC: 1.00
p=0.0082
Sensitivity%
Identity%

B


IL-8 Group A_C
IL2-Ra Group A_C
Sensitivity%
100% - Specificity%
AUC: 0.803
p=0.044
AUC: 0.8571
p=0.0225
Sensitivity%
Identity%

C

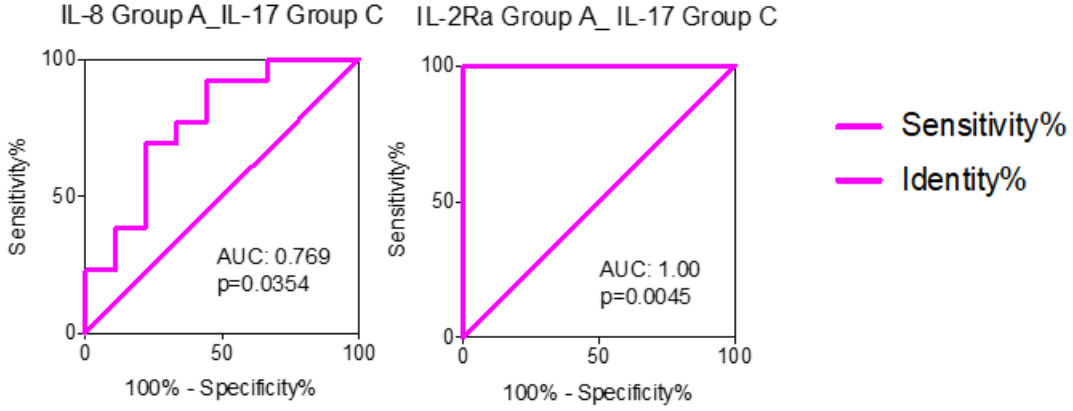

IL-8 Group A_IL-17 Group C
IL-2Ra Group A_ IL-17 Group C
Sensitivity%
100% - Specificity%
AUC: 0.769
p=0.0354
AUC: 1.00
p=0.0045
Sensitivity%
Identity%

Figure 3: Predicting the prognosis of RD using serum cytokines levels. A) ROC curves of IL-1β, TNF-α, IL-8 and IL-2Ra expression in A group. **B)** ROC curves of IL-8 and IL2-Ra expression in C group. **C)** ROC curves of IL-8 and IL2-Ra expression predicted elevate IL-17 expression in C group.

DISCUSSION

Inflammation plays a pivotal role in the progression of DM1 and its associated complications, such as RD (Tabakoglu & Celik, 2024). The physiopathology of DM1 leads to differential activation of several immune cells, contributing to modified the inflammatory responses during DM1 evolution. Actually, immunotherapies have been considered as a preventive therapy in DM1 (Van Rampelbergh et al., 2024) and RD (Reynolds et al., 2023). This study screens specific profiles of pro- and anti-inflammatory mediators during DM1 progression, from a recent diagnosis (0-3 months) to more than 5 years of evolution. These findings reveal immune-modulated patterns in DM1 patients, which could contribute to the development of targeted approaches. The chronic systemic inflammation accompanying DM1, results in blood-retinal barrier (BRB) dysfunction (Voabil et al., 2017), leading to increased BRB permeability and consequent RD development, alongside the presence of inflammatory mediators in the retinal environment (Kokona et al., 2018) and the response of the retinal immune system (Kinuthia et al., 2020).Our findings demonstrate an early pro-inflammatory context in group A (0-3 months DM1 evolution), which is delayed in the C group (2-5 years DM1 evolution) for some of the analyzed pro-inflammatory mediators, while others exhibit an increase in pro- and anti-inflammatory mediators at the same time point. Consequently, our study delineates the inflammatory status of DM1 patients at different stages of the disease progression and its implications for RD development.

As the data reflect, the DM1 patients exhibit a predominant pro-inflammatory state from the onset of diabetes, as previously reported (M. Guo et al., 2024), characterized by higher expression of IL-1β and TNF-α in group A. Elevated IL-1β levels in early-stage of DM1 patients have been associated with poorer DM1 management (Cano-Cano et al., 2022). However, in the later stages of the disease, the onset of RD in DM1 patients does not show significant correlations with systemic IL-1β, IL-8 and IL-10 levels, although significant correlations with RD have been established in aqueous and vitreous humor samples (Jin et al., 2024). The significant increase in serum levels of TNF-α, IL 1β, IL-

8, IL2-Ra, IL-18 and MCP-1 observed in group A underscores chronic inflammation exposure, contributing to BRB disruption (Mason et al., 2022) and facilitating the RD development in later of DM1 stages (group C and D). In the Spanish National Health System, DM1 patients are included in retinal analysis programs for early RD detection starting five years after diagnosis. However, the pro-inflammatory profile detected in group A, could be strong evidence for including molecular biomarkers into early RD detection, potentially integrating this approach into standard clinical practice.

Furthermore, recent findings suggest a positive association between predicted genetic for RD risk and IL-8 that could contribute to an increase in IL2-Ra, G-CSF and IL-12p70 (Shi et al., 2023). These results align with the observed association between IL-8 and the reduced mRNFL thickness in the group C compared to group H. The progressive reduction in retinal thickness from group C to group D, suggests the presence of early RD without clinical symptoms in group C (Carmichael et al., 2022), which advances to a significant reduction in group D, indicative of an advanced RD status. In this context, the elevated IL-8 levels observed in both groups C and D, along with its correlation with structural retinal changes in the early stage of DM1, suggest that IL-8 potential could serve as a potential biomarker for early RD detection.

Group C showed an increase in blood glucose levels, likely due to a desensitization to insulin therapy. The required increase of insulin doses concurs with the differential expression of IL-17 and IL-12 (p70) in group C. Both cytokines have a fundamental role in the development of RD, favouring the pro-inflammatory environment that triggers neurodegeneration (Shi et al., 2023). Moreover, the increase in insulin dose may also be behind RD and its progression as shown in other studies (Y. Guo et al., 2024).

IL-17 has a significant impact on the DM1 progression (Semeran et al., 2013) by modulating the retinal immune response. It plays a role in the phenotypic polarization of retinal microglia (Chen et al., 2023). The activation and proliferation of microglia and resident macrophages can lead to either retinal protection or degeneration, depending on the molecular signature and polarity state of the immune retinal cells. We and others have demonstrated that microglial cells can adopt a protective role by transforming from a pro-inflammatory phenotype to a reparative phenotype (Arroba et al., 2016; Cano-Cano et al., 2021; Fouda et al., 2018; London et al., 2011). In this regard, our findings indicate an acute increase in IL-17 levels in group C of patients, where the presence of HRF with a smaller diameter and high intensity, is representative of an inflammatory response mediated by microglial cells (Vujosevic et al., 2017). However, the anti-inflammatory

cytokines patterns showed two profiles: those that remain elevated throughout the disease (IL-13 and IL-1ra), and those that increase their expression, specifically in group C (LIF and IL-4). The elevation of the anti-inflammatory cytokine profile in group C could be associated with an initial protective response that could be reflected in retinal processes. IL-4 and IL-13, both anti-inflammatory cytokines, play a crucial role in the downregulation of the Th1 lymphocyte phenotype and are considered important mediators in pathology of the autoimmune diseases. The sustained elevation of IL-1Ra and IL-13 from Early to Advanced-stages of our DM1 cohort may be associated with hyperglycemic disorders and the inhibition of the pro-inflammatory events triggered by DM1 progression (Scuderi et al., 2015). Deficient IL-4 production observed at the onset of DM1 might contribute to the development of diabetes by allowing the inflammatory/autoimmune process in pancreatic islets to progress (Berman et al., 1996). However, the increased cytokine levels detected in group C could indicate a shift in the cytokine profile towards the induction of anti-inflammatory responses. Similarly, LIF has been associated to a favourable response in pancreatic islet cell transplantation, with detectable levels in patients exhibiting good engraftment giving superior graft survival (Van Der Torren et al., 2016). In our patients' cohort, we observe a significant increase in LIF levels in group C, potentially contributing to the induction of anti-inflammatory response at this specific stage of DM1 progression. Additionally, IL-16 and TNF-α levels were lower in all DM1 patient groups compared with group H, aligning with protecting immune response against DM1 progression (Vendrame et al., 2012).

The detection of IL-13, LIF, IL-4 and IL-1Ra in biological fluids has been associated with neuroprotective effect in retinal disorders (Amorim et al., 2022; Lv et al., 2022; Yang et al., 2018), as demonstrated by studies linking their presence in systemic samples to the progression of RD (Hang et al., 2014; Quevedo-Martínez et al., 2021). In this regard, the elevated serum levels of these cytokines may be involved in supporting the immune protective functions of the retina.

Our analysis also revealed a correlation between altered retinal parameters and the expression of identified biomarkers, namely IL-8, IL-2Ra and IL-17. In patients at the onset of DM1s, these biomarkers demonstrated predictive value for detecting retinopathy alterations in later stages, such as those observed in C group. Nevertheless, further studies are essential to corroborate this association across different clinical context, as the precise significance of this relationship remains unclear. Additionally, it is important to note that the observed cytokine profile expression and the diagnosis of RD may not have a direct

causal link.

The imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine production during DM1 progression highlights immunological targets at both Early and Advanced-stages of the disease, with implications for the subsequent development of RD in the years following diagnosis. Unique cytokine signatures identified in serum samples may hold predictive value or offer insight into clinical outcomes. Cytokines such as IL-1β, TNF-α and IL-8 could be considered as potential targets for immunotherapy during the initial steps of DM1, potentially playing a role in preventive management strategies by modulating the immune response to delay disease progression. In the Advanced-stage of DM1, IL-17 emerges as a critical factor in RD development and BRB disruption, making it a promising target for immunological treatment at this phase of the disease. It is important to note that, therapeutic approaches should not only focus on inhibiting pro-inflammatory cytokines but also focus on enhancing anti-inflammatory responses mediated by cytokines such as IL-4, LIF, IL-13 or IL-1Ra. This comprehensive strategy could improve disease clinical management and control, particularly in relation RD, and may represent a valuable path for future treatment options.

STUDY LIMITATIONS

We acknowledge certain limitations in our study, including the small cohort size. The study encompassed patients with Early-stage RD via SD-OCT, as well as those with Advanced RD. Based on these findings, it would be valuable to carry out a study that analyses subgroups of patients with different degrees of RD and their associated inflammatory profiles. Furthermore, incorporating imaging tests earlier in the progression of DM1 progression, within the first three years, could facilitate the early detection of RD. Considering the constrained sample size, further validation within a larger clinical cohort is imperative. Additionally, the functional role of the cytokine patterns observed remains ambiguous; it is unclear whether they merely act as biomarkers of DM1 progression and RD development or play a more active role. Moreover, the diagnostic utility of these two putative biomarkers requires confirmation across diverse populations. Another limitation of this study is the potential for confounding factors that were not controlled, such as, cigarette smoking, alcohol intake, exercise and dietary habits among the enrolled patient.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table 1: Serum cytokine levels in the study participants

Variable	Group H (n=23)	DM1 groups				*p*-value
		Group A (n=20)	Group B (n=14)	Group C (n=10)	Group D (n=30)	
Pro-inflammatory						
IL-1β	1.00 ± 0.52	1.66 ± 0.70[a]	1.28 ± 0.77	1.17 ± 0.38	0.93 ± 0.59	**0.039**
IL-2Ra	0.80 ± 0.19	1.21 ± 0.08[a]	1.17 ± 0.34	1.48 ± 0.12[a]	1.50 ± 0.08[a,c]	**0.003**
IL-7	0.97 ± 0.10	1.01 ± 0.07	0.94 ± 0.14	1.05 ± 0.16	1.10 ± 0.15	0.309
IL-8	0.99 ± 0.50	2.17 ± 0.83[a,c]	1.35 ± 0.53	2.80 ± 1.49[a,c]	2.25 ± 0.96[a,c]	**0.012**
IL-12 (p70)	0.76 ± 0.55	1.52 ± 0.42	0.77 ± 0.60	2.05 ± 0.82[a,c]	1.78 ± 0.65[a,c]	**0.047**
IL-16	1.03 ± 0.03	1.03 ± 0.16	1.39 ± 0.42	0.90 ± 0.22[c]	0.70 ± 0.09[a,b,c]	**0.007**
IL-17	1.00 ± 0.52	1.14 ± 0.42	0.87 ± 0.58	1.88 ± 0.54[a,b]	1.37 ± 0.81	**0.031**
IL-18	1.00 ± 0.22	2.04 ± 1.24[a]	1.73 ± 0.60[a]	1.50 ± 0.33	2.02 ± 1.16[a]	**0.039**
IFN-γ	1.00 ± 0.06	1.07 ± 0.17	0.67 ± 0.34	0.82 ± 0.33	0.92 ± 0.24	0.267
TNF-α	1.01 ± 0.10	1.15 ± 0.06[a]	0.97 ± 0.10[b]	1.00 ± 0.09[b]	1.02 ± 0.12[b]	**0.009**
TNF-β	1.00 ± 0.26	0.52 ± 0.28[a]	0.56 ± 0.25[a]	0.66 ± 0.22[a]	0.62 ± 0.14[a]	**0.047**
Anti-inflammatory						
IL-1ra	1.00 ± 0.42	1.87 ± 0.85[a]	1.79 ± 0.91[a]	1.57 ± 0.64[a]	1.45 ± 0.37[a]	**0.015**
IL-4	0.94 ± 0.17	0.93 ± 0.19	1.07 ± 0.26	1.29 ± 0.37[a,b]	1.17 ± 0.32	**0.013**
IL-9	1.00 ± 0.14	0.78 ± 0.19[a]	0.76 ± 0.30[a]	0.82 ± 0.19[a]	0.79 ± 0.17[a]	**0.012**
IL-13	1.00 ± 0.18	1.84 ± 0.59[a]	1.63 ± 0.66[a]	2.05 ± 1.23[a]	1.58 ± 0.57[a]	**0.027**
LIF	1.00 ± 0.24	1.18 ± 0.50[d]	1.05 ± 0.25[d]	2.15 ± 0.54[a]	1.06 ± 0.17[d]	**0.050**
TRAIL (CD253)	1.00 ± 0.37	0.83 ± 0.38	1.34 ± 0.49	1.07 ± 0.90	0.67 ± 0.63	0.541
Chemokines						
CTACK (CCL27)	1.03 ± 0.14	1.17 ± 0.71	3.45 ± 2.69	0.88 ± 0.24	1.15 ± 0.56	0.304
CXCL1 (GROα)	1.00 ± 0.05	0.95 ± 0.06	0.90 ± 0.03[a]	0.88 ± 0.05[a]	0.80 ± 0.05[a,b]	**0.003**
Eotaxin	1.00 ± 0.38	1.54 ± 0.84	2.07 ± 1.82	3.25 ± 2.40[a]	1.85 ± 0.83	**0.016**
IP-10	0.99 ± 0.34	2.26 ± 1.76[a]	2.02 ± 1.03[a]	1.098 ± 0.30[b]	1.47 ± 0.87	**0.016**
MCP-1	0.99 ± 0.38	1.73 ± 0.73[a]	2.11 ± 1.12[a]	1.80 ± 0.62[a]	1.57 ± 0.31[a]	**0.007**
MIF	1.00 ± 0.34	2.31 ± 1.22[a]	2.26 ± 0.85[a]	1.51 ± 1.08	1.39 ± 0.86	**0.037**
MIG	1.00 ± 0.36	1.74 ± 0.63	2.40 ± 0.87[a]	2.25 ± 0.83[a]	1.55 ± 1.41	**0.049**
MIP-1α	0.99 ± 0.18	1.22 ± 0.42	1.36 ± 0.61	1.39 ± 0.49	1.29 ± 0.61	0.309
MIP-1β	1.01 ± 0.06	0.90 ± 0.16	0.67 ± 0.18[a]	0.84 ± 0.21[a]	0.79 ± 0.12[a]	**0.003**
Growth-Factors						
SCF	1.00 ± 0.26	0.90 ± 0.20	0.78 ± 0.28	0.87 ± 0.24	1.01 ± 0.21	0.399
M-CSF	1.02 ± 0.28	1.86 ± 0.58[a]	1.42 ± 0.29	1.23 ± 0.22	1.98 ± 0.95[a]	**0.044**
G-CSF	1.01 ± 0.27	1.53 ± 0.87	1.44 ± 0.31	1.68 ± 0.35[a]	1.47 ± 0.56	**0.048**
GM-CSF	1.00 ± 0.49	1.22 ± 1.18	1.66 ± 0.10	2.69 ± 0.07	1.71 ± 0.69	0.104
HGF	1.03 ± 0.15	0.81 ± 0.21	1.04 ± 0.42	1.02 ± 0.28	0.94 ± 0.28	0.543
PDGF-BB	1.00 ± 0.41	1.32 ± 0.31	1.35 ± 0.19	0.93 ± 0.44	0.82 ± 0.33[b,c]	**0.013**

Supplementary Table 2: Comparison of cytokines in the serum between C and D groups and correlations between cytokines levels and OCT determinations.

Correlations		Group C		Group D	
		Spearman´s		Spearman´s	
OCT determinations	Cytokine	Rho (ρ)	*p* value	Rho (ρ)	*p*-value
mRNFL	IL-8	0.928	**0.008***	-0.174	0.742
mRNFL	IL-17	-0.900	**0.037***	-0.543	0.266
mRNFL	IL2-Ra	-0.500	0.663	-0.890	**0.039***
OCTA	TNF-a	0.092	0.813	-0.670	**0.048***
OCTA	MIP-1b	-0.619	0.102	-0.722	**0.028***
OCTA	IL1-Ra	0.238	0.571	0.880	**0.021***

mRNFL: Macular retinal nerve fiber layer, FAZ: Foveal avascular zone. Correlation coefficient is indicated as the Spearman´s Rho (ρ). * $p \leq 0.05$.

Supplementary Table 3: Comparisons of circulating cytokines in DM1 groups as predictors of RD.

Groups	Cytokine	AUC (95% CI)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	*p*-value
H *vs* A	IL-1β	0.811(0.6137-1.009)	66.67	80.00	**0.022**
	TNF-α	0.900(0.7133-1.087)	83.33	80.00	**0.028**
	IL-8	0.779(0.5617-0.9968)	81.82	71.43	**0.050**
	IL-2Ra	1.00(1.00-1.00)	100.00	100.00	**0.008**
A *vs* C	IL-8	0.803(0.5831-1.023)	66.67	72.73	**0.044**
	IL-2Ra	0.857(0.5070-1.116)	80.00	100.00	**0.019**
	$IL\text{-}8_A/IL\text{-}17_C$	0.963(1.00-1.00)	100.00	88.89	**0.006**
	$IL\text{-}2Ra_A/IL\text{-}17_C$	1.00(1.00-1.00)	100.00	100.00	**0.004**

5.3 Estudio III

Firma proteómica inflamatoria en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con diabetes mellitus tipo 1: Un patrón diferencial de expresión.

RESUMEN

La DM1 es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las células β-pancreáticas, lo que conduce a que las personas que lo padecen sufran hiperglucemia crónica y, en etapas avanzadas, al desarrollo de complicaciones secundarias como la RD. Para poder comprender mejor los mecanismos involucrados en el desarrollo y progresión de la DM1, los pacientes fueron divididos en dos grupos: Early (temprano) que comprende a aquellos pacientes que llevan padeciendo la enfermedad entre menos de tres meses y un año, y el grupo Advanced (avanzado) que engloba a todos los pacientes que llevan más de un año con la DM1, además de estos un grupo de individuos sanos se introdujo como control (H).

Dado que la obtención de células β de los pacientes plantea serios desafíos, se presenta necesaria la búsqueda de alternativas que nos permitan evaluar el estado de la enfermedad. El análisis proteómico de PBMCs y el análisis sérico de mediadores inflamatorios nos ofrecen un enfoque ideal para la identificación de potenciales biomarcadores y elucidar de esta forma los mecanismos subyacentes a la progresión de la DM1 y sus complicaciones asociadas.

Los resultados revelan proteínas diferencialmente expresadas entre los grupos e involucradas en vías biológicas relacionadas con el transporte de vesículas, la respuesta inmune y el metabolismo. Se identificó un conjunto de proteínas down-reguladas, relacionadas con la vía inmune de señalización y producción de IL-12 en macrófagos (APOA2, APOC1, APOC3, PON1, AAK1 y CBL). Para corroborar estos datos, se midieron los niveles de IL-12 en el suero de los pacientes y se comprobó que el grupo Early presentaba niveles de IL-12 significativamente incrementados comparados con los del grupo H (p<0.001), en cambio el grupo Advanced a pesar de presentar una tendencia a niveles elevados de IL-12, esta no es estadísticamente significativa.

La proteína CBL fue determinada como un potencial marcador del estado inmunológico

de los pacientes durante la progresión de la DM1, mientras que la proteína HRG emergió como un potencial biomarcador para el pronóstico de las complicaciones secundarias, como la RD. Estos hallazgos podrían contribuir al desarrollo de nuevas estrategias para el manejo y tratamiento de DM1, con especial enfoque en el estado inmunológico específico durante la progresión de la patología.

Inflammatory proteomic signatures in Peripheral Blood Mononuclear Cells from type 1 diabetes mellitus patients. A differential pattern of expression

ABSTRACT

DM1 is an autoimmune disease characterized by the destruction of pancreatic β-cells, leading to chronic hyperglycaemia and the development of Advanced-stages of secondary diabetic complications such as RD. To understanding the mechanisms involved in the development and progression of DM1 in the patients, those were separated into two groups, the DM1 Early-stage (≤12 months), DM1 Advanced-stage (>12 months) and a group with healthy individuals were included. Considering the challenges of obtaining β-cells from patients, it is essential to explore alternatives to evaluate the disease status. The proteomic analysis of PBMCs and the serum analysis of inflammatory mediators offer an ideal approach for identifying of biomarkers and elucidating the mechanisms underlying DM1 progression and its associated complications. Our results reveal a differentially expressed proteins involved in biological pathways such as immune response, vesicular trafficking and metabolism. A hub of altered proteins related to immunological pathways, identifying a down-regulated profile in APOA2, APOC1, APOC3, PON1, AAK1 and CBL proteins, associated with IL-12 Signaling and Production in Macrophages. In order to corroborate these data, the IL-12 levels in serum of the Early-stage DM1 group were significantly increased compared to the H group (p<0.001), but the DM1 Advanced-stage group shows a lower profile in IL- 12 levels. CBL protein has been determined as a potential immunological status of DM1 progression, while HRG has been elicited as a biomarker for the secondary complications prognosis. These findings may contribute to develop new strategies in the DM1 management and treatment, with a special focus on immunological specific status during the DM1 progression.

MATERIALS AND METHODS

Study participants

For this study, 71 patients diagnosed with DM1 were recruited from the Hospital Universitario Puerta del Mar (HUPM) by the personal from the Endocrinology and Nutrition Department, using the *American Diabetes Association criteria* (Care, 2015). All the patients from this study follows the following criteria: 1) continuous insulin treatment

since onset, 2) good glycemic control, 3) non-related chronic infectious diseases or 4) other autoimmune/inflammatory pathologies. In order to evaluate the good control of the DM1, a glycated hemoglobin levels of 7% or less is accepted (Battelino et al., 2019). Additionally, 23 healthy control volunteers were recruited, matching the patients for ethnicity and without any immunological alteration or chronic infection.

In order to study the DM1 progression, all the patients were separated in two groups based on the duration of the diabetes since onset, those groups are called Early-stage DM1 (≤12 months) and Advanced-stage DM1 (>12 months). For SD-OCT and proteomic analysis a random subset of 9 subjects per group were selected.

The presence of RD was evaluated following the criteria and scales from the *International Council of Ophthalmology* (Wong et al., 2018).

Analytical variables

A sample of venous blood was taken for biochemical analysis at the time of inclusion in the study, in all cases after a minimum of 8 hours of fasting. Blood samples will be taken at the HUPM following the established protocol and will be kept at room temperature. Finally, the serum was extracted and quantified in the HUPM Clinical Analysis Service. Other analyses include the levels of glucose, HbA1c, uric acid and C-peptide in serum, the percentage of leukocytes in the blood samples (neutrophils, basophiles, eosinophils, monocytes and lymphocytes). A sample of urine was used to measure the albumin to creatinine ratios (ACRU).

SD-OCT evaluation

To evaluate the retinal status of the retina, spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) images were captured for the qualified personnel of Ophthalmology Department from HUPM, and subsequently reviewed to ensure proper, centering beam placement, targeting and signal strength. The retinography, OCT and OCTA images were obtained by DRI OCT Triton (Topcon Medical Systems, Inc, Oakland, NJ, USA), a spectral-domain OCT employing a customized 6x6 mm scan protocol centered on the fovea. OCTA derived parameters were automatically calculated with IMAGEnet 6 software (version 1.17.9720; Topcon Medical Systems, Inc, Oakland, NJ, USA). The Foveal avascular zone (FAZ) area with the SCP was manually delineated in the using the

caliper area tool in IMAGEnet 6 and the results were expressed in square millimetres (mm^2). Vessel density in both SCP and deep capillary plexus was assessed from 3 × 3 mm OCT-A scans using the automated software algorithm with the segmentation performed as previously described (Stanga et al., 2016). Ophthalmological evaluations were conducted in 18 participants (n = 9 per group) from both the Advanced-stage and Healthy control group.

Approval, registration and participant consent procedures

The study protocol was approved by the institutional Research Committee of the province of Cádiz (registration number 05.20). Prior to enrollment, all participants (healthy volunteers and DM1 patients), received detailed information regarding the study and were provided with written informed consent in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. To ensure confidentiality, all the data obtained were pseudo-anonymized and stored in a secure database accessible only to the research team.

Serum cytokine analysis

Venous blood samples were collected from all participants for both biochemical and cellular evaluations. Additionally, a separate blood draw was performed to obtain serum, which was used for cytokine biomarker assessment in 15 individuals from each study group: Early-stage DM1, Advanced-stage DM1, and Healthy Controls (total n=45). For serum preparation, clot-activator tubes were employed and kept at room temperature for a minimum of 30 minutes to allow clot formation, followed by centrifugation at 1500 g for 10 minutes. The resulting serum was aliquoted and stored at -80 °C until cytokine measurements were conducted.

Cytokine profiling was performed using the Bio-Plex Pro™ Human Cytokine kit (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA) according to the manufacturer's guidelines, enabling the quantification of IL-12 (p70) and additional cytokines in serum. Measurements were obtained with the FLEXMAP 3D® system (Luminex Corporation, TX, USA) based on Luminex technology. To ensure reliability, all samples were analyzed in duplicate.

PBMCs isolation

Peripheral blood samples from the same 45 subjects as the cytokine analysis were collected in anticoagulant tubes (EDTA). The whole blood extracted from the EDTA

tubes were diluted 1:1 in PBS and then the PBMCs were isolated by standard density gradient, layering carefully the diluted blood over the same volume of Histopaquet 1077 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). The tubes were centrifuged at 1900 rpm 25 minutes and to prevent the disruption of the layers, slow acceleration and no brakes were used. After centrifugation, the PBMC interface layer was collected, transferred to a new tube, and the cell rinsed twice in PBS (centrifugations; 1500 rpm 10 minutes), with the last centrifugation, supernatant was removed, and the cells were cryopreserved and maintained at -80ºC until analysis.

Proteomic analysis

A random subset of 27 PBMCs samples (n = 9 per group) were used for proteomic analysis. A volume of 250 µL of extraction buffer (7M Urea, 2M Thiourea, 0.4% CHAPS, 200mM DTT) was added to each pellet of PBMCs for the protein extraction by cell lysis. All the samples were sonicated and centrifuged (13.000 rpm 15 min), for further protein precipitation, supernatants were transferred to another tube overnight with 5X vol of acetone at -20ºC. The next day the samples were centrifuged (13.000 rpm 15 min), and supernatants discarded, and the pellets resuspended in 100 µL of extraction buffer. The protein content was quantified by the Bradford method and a minimal amount of 50 µg of protein per sample was trypsinized (GOLD, Promega) and digested following the FASP method with minimal modifications (Wiśniewski et al., 2009).

The resulting peptides were dried under vacuum, and then resuspended in 0.1% trifluoroacetic acid, and subsequently desalted and concentrated using reverse-phase microcolumns (C18 OMIX, Agilent). For the proteomic analysis, 200ng of each sample was injected into an EVOSEP ONE system (Evosep) coupled online to a TimsTOF Pro tandem mass spectrometer (Bruker) operating in parallel accumulation-serial fragmentation (PASEF) mode. Data-dependent adquisition (DDA-PASEF) was performed by using a 30 SPD method. Raw mass spectrometry data were processed with MaxQuant software (version 1.6) for protein identification and quantification 16. To identify differentially expressed proteins between groups, label-free quantification (LFQ) analysis was performed using Perseus software 17 (https://www.maxquant.org/perseus/). Only proteins with at least one unique peptide at a false discovery rate (FDR) of 1% at the PSM level were considered for analysis.

Data processing and statistical rationale

Protein identification and quantification were conducted using the PEAKS software

For the protein identification and quantification PEAKS software (Bioinformatics Solutions Inc. in Waterloo, CA, USA) was used. Database searches were conducted against canonical human Uniprot/Swissprot entries, excluding the isoforms. Precursors and fragment mass tolerances were set to 20 ppm and 0.05 Da, respectively. LFQ based on peak area was carried out using the PEAKS Q module inside the PEAKS software.

Proteomic data were imported into the Perseus platform 17 for further analysis. Data were log2-transformed, filtered to retain proteins with at least 70% valid values and missing values imputed from a normal distribution and categorically annotated to define conditions. Filter row based were performed on categorical columns to eliminate proteins only identified by site, reverse and potential contaminant. A two-sample student's *t*-test differential expression analysis was used with a *p*-value truncation (0.05 threshold p-value). Differential protein expressions were assessed by comparing the Healthy group (H) against the Early and Advanced-stage DM1 groups, as well as by comparing the DM1 groups each other to identify protein disease-potential disease-specific differences. Differentially expressed proteins (DEPs) between groups (Early-stage, Advanced-stage and Healthy) were considered with a significance threshold of $p \leq 0.05$. The DEPs proteins were classified as up- or down-regulated when -log10 (*p*-value)>1.3 and log2 (fold-change rates) were >1 for up- and <-1 for down-regulation, respectively. ROC curve analysis evaluated the predictive value of elected proteins by using SPSS software, indicating sensitivity and specificity percentages, the AUC and 95% confidence intervals. A p-value <0.05 was considered statistically significant. The functional role of proteins was analyzed by using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen) and Reactome (https://reactome.org/) software, String and functional protein association networks by using string software (https://string-db.org/). The functional analysis was carried out by taking into account the classification made by IPA software of canonical pathways and diseases and function classifications.

For the cytokine and SD-OCT analysis, the normal distribution of every data set was established using the Komolgorov-Smirnov test and subsequently, one-way ANOVA for multiple groups of data was performed by the ANOVA *F*-test (normal distribution) or by the Kruskal-Wallis test (no normal distribution). For comparisons of two groups of data Student´s *t*-test (normal distribution) or Mann-Whitney *U*-test (no normally distributed data). Bivariate correlations between proteomic DEPs and SD-OCT or clinical data were

performed using Spearman´s rank correlation coefficient (non-parametric data) in the SPSS software. Those with a *p*-value ≤0.05 were considered statistically significant. Additional data processing and graphs were done using GraphPad Prism (version 8.0.1), R commander and Perseus.

RESULTS

Clinical characteristics of serum samples and proteomic profiles assessment

A schematic representation of the experimental flowchart is shown in **Figure 1A**. Biological samples were collected from two principal groups: patients diagnosed with DM1 and healthy controls. The clinical characteristics of both DM1 patients and healthy control participants were summarized and analyzed. **Table 1** presents the main demographic and clinical features of the individuals included in the study. No significant differences were observed between the groups in terms of specific immune cell parameters. No significant differences were observed in age ($p = 0.064$) between H and the Early-stage DM1 group, but we found significant differences in the Advanced-stage DM1 group compared to H ($p = 0.003$) and Early-stage DM1 group ($p < 0.001$). It is expected that HbA1c levels were elevated in DM1 Early-stage compared to H and compared to DM1 Advanced-stage group ($p < 0.001$). In this regard, the blood glucose showed a significant increase in both DM1 groups compared to H ($p = 0.004$ and $p < 0.001$, respectively; **Figure 1 B-C**).

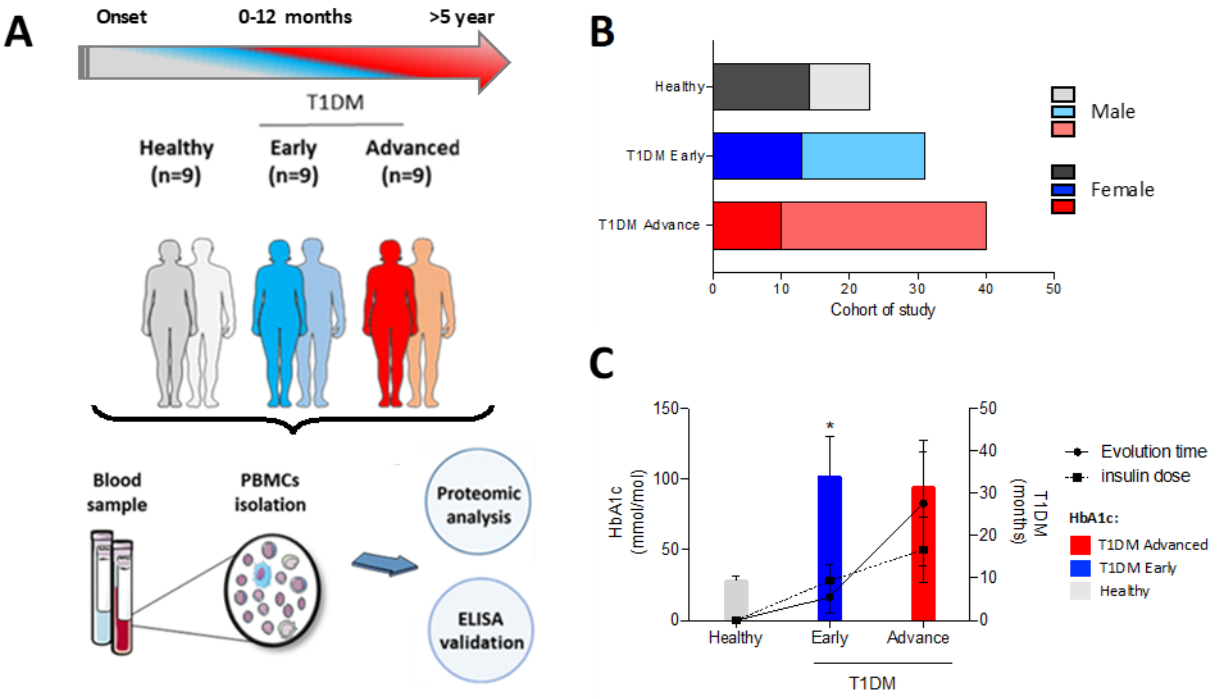


Figure 1. Experimental workflow. A) Schematic representation of the experimental design. Early-stage DM1, Advanced-stage DM1 patients and Healthy volunteers were selected according to inclusion criteria. PBMCs were isolated from the blood samples of each participant (n = 9 per condition). Finally, an LFQ proteomic approach was applied, together with bioinformatics analysis (statistic and functional classification) to identify differentially expressed proteins between groups. Graphical representation of donors **B)** gender, **C)** HbA1c, progression in years of DM1 and insulin doses. Early-stage DM1 group: blue; Advance-stage DM1 group: red; Healthy group: grey.

Table 1. Main characteristics of the cohort of healthy and DM1 patients.

Variable	Healthy (n=23)	DM1 groups (n=71)		*p*-value	
		Early (n=31)	Advanced (n=40)		
Age (years)	30,17 ± 8.48	27.87 ± 12.12	40.05 ± 11.69	Healthy *vs* Early Healthy *vs* Advanced Early *vs* Advanced	0.299 **<0.001** **0.009**
Gender F/M	11/9	17/14	10/30		
Glucose (mg/dL)	90.95 ± 6.81	148.71 ± 69.06	157.13 ± 77.65	Healthy *vs* Early Healthy *vs* Advanced Early *vs* Advanced	**<0.001** **<0.001** >1.000
Insulin dose (IU)	-	28.20 ± 11.7	50.10 ± 23.50	Early *vs* Advanced	**<0.001**
Uric acid (mg/dL)	5.15 ± 1.21	4.03 ± 1.24	4.12 ± 1.19	Healthy *vs* Early Healthy *vs* Advanced Early *vs* Advanced	**0.003** **0.003** >1.000
HbA1c (DCCT%)	4.70 ± 0.36	8.50 ± 2.66	7.45 ± 1.30	Healthy *vs* Early Healthy *vs* Advanced Early *vs* Advanced	**<0.001** **<0.001** >1.000
C-peptide (ng/mL)	1.91 ± 1.23	0.71 ± 0.45	0.46 ± 0.48	Healthy *vs* Early Healthy *vs* Advanced Early *vs* Advanced	**<0.001** **<0.001** 0.348
Neutrophil (%)	52.49 ± 8.31	49.77 ± 9.24	53.28 ± 8.65	Healthy *vs* Early Healthy *vs* Advanced Early *vs* Advanced	0.387 0.932 0.194
Lymphocyte (%)	36.17 ± 7.50	38.39 ± 7.48	33.83 ± 8.21	Healthy *vs* Early Healthy *vs* Advanced Early *vs* Advanced	0.251 0.705 0.146
Monocyte (%)	8.14 ± 1.27	8.39 ± 2.36	8.04 ± 1.68	Healthy *vs* Early Healthy *vs* Advanced Early *vs* Advanced	0.809 0.990 0.806

Eosinophil (%)	2.33 ± 0.99	2.91 ± 1.69	4.07 ± 3.03	Healthy *vs* Early Healthy *vs* Advanced Early *vs* Advanced	0.557 0.054 0.308
Basophil (%)	0.57 ± 0.27	0.52 ± 0.28	0.76 ± 0.28	Healthy *vs* Early Healthy *vs* Advanced Early *vs* Advanced	0.636 0.076 **0.014**
mRNFL (µm)	300.63 ± 11.36	-	286.04 ± 21.67	Healthy *vs* Advanced	**0.002**
FAZ (µm²)	-	-	257.90 ± 139.19	-	-
Angiography (mm⁻¹)	-	-	41.23 ± 2.38	-	-

F/M: Female/male, HbA1c: Glycated hemoglobin levels, mRNFL: Macular retinal nerve fiber layer, FAZ: Fovel avascular zone. Data are shown as mean ± SD. Bold numbers indicate statistical significance $p \leq 0.05$.

Differential expression patterns between common proteins of the DM1 Early and Advanced-stage DM1 groups.

A LFQ proteomic analysis was performed to examine differences in protein expression of PBMCs from individuals with Early-stage DM1 and Advanced-stage DM1 in comparison with healthy controls. Across the comparisons, an average of 2,462 proteins were identified. Among these, 227 proteins (Early-stage DM1 *vs* Healthy) and 309 proteins (Advanced-stage DM1 *vs* Healthy) showed significant alterations, while 165 proteins differed between Early and Advanced-stage DM1 (-log10 p-value > 1.3). Interestingly, the proteomic profile of the Early-stage DM1 group was more comparable to that of healthy individuals, but diverged from the Advanced-stage DM1 group (**Figure 2A**). Furthermore, the Early-stage DM1 group exhibited a greater number of upregulated proteins relative to healthy controls (30 proteins) compared with the Advanced-stage group (10 proteins). Conversely, more downregulated proteins were detected in Advanced-stage DM1 *vs* Healthy (88 proteins) than in Early-stage DM1 *vs* Healthy (38 proteins) (**Figures 2B–C**). A detailed list of identified proteins and normalized intensities for these comparisons is provided in the Supplementary material (**Supplementary Table 1**).

Furthermore, we found 27 proteins (73%) up-regulated and 20 downregulated proteins (18,5%) exclusively in Early-stage DM1 group compared to H. In other hand, 7 proteins (18,9%) were up-regulated and 70 proteins (64,8%) were down-regulated specifically in DM1 Advanced-stage comparing to healthy group (**Figure 2D**). Only 3 common proteins (8,1%) were up-regulated and 18 common proteins (16.7%) for both DM1 groups

compared to H.

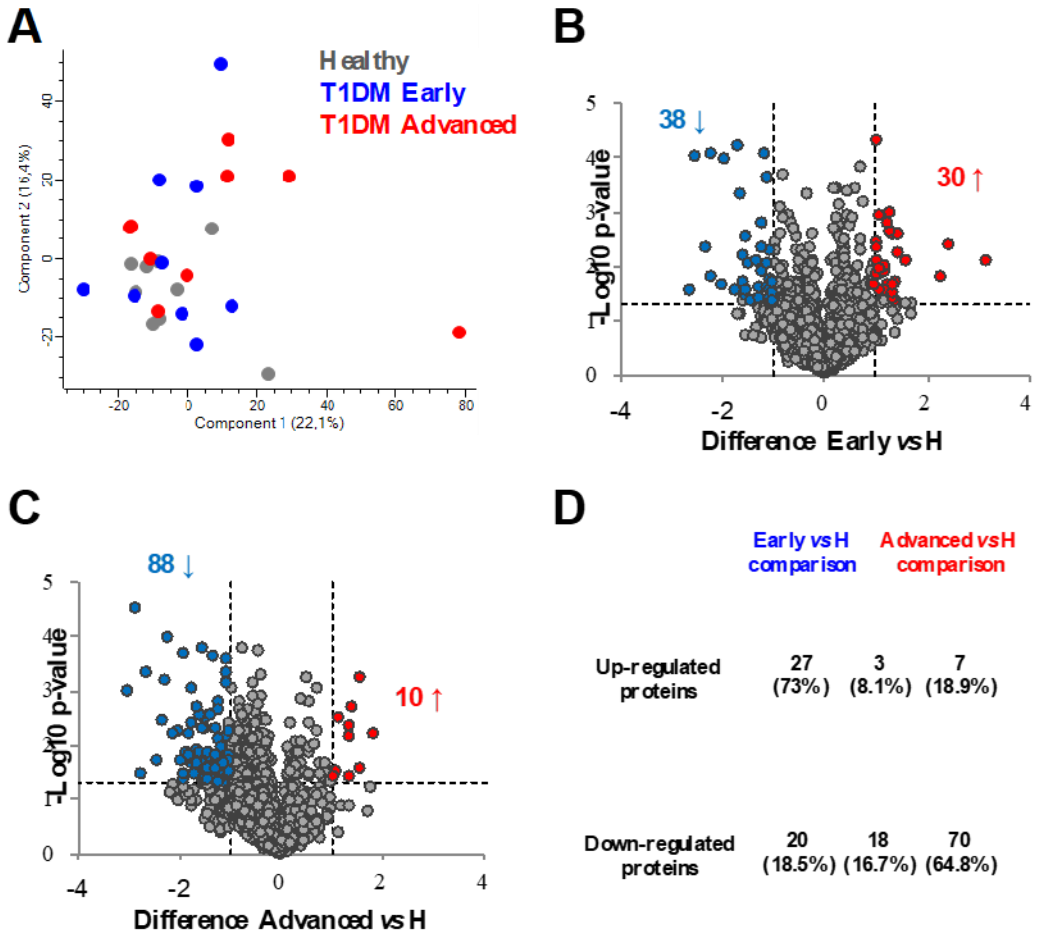


Figure 2. Proteomic study population clustering. Volcano plots including the number of proteins up- (red) and down- (blue) regulated in **A**) Early-stage DM1 group, **B)** Advanced-stage DM1 group compared to Healthy controls group. **C)** Advanced-stage DM1 compared to Early-stage DM1 group. **D)** Number of DEPs obtained from proteomic analysis in Early-stage (blue) and Advanced-stage DM1 groups (red) compared with Healthy controls. A schematic representation of the changes seen for the common DEPs found **E)** up- or **F)** down-regulated are shown, together with graphical representations of the Log2 (LFQ intensities) recorded for selected proteins identified through predictive analysis. **p*-value ≤0.05.

We detected C59, LYAM and ENAM up-regulated common proteins presented a higher expression in the Early-stage DM1 group compared to the Advanced-stage DM1 group (**Figure 2E**). Related to down-regulated common proteins (CYTB, RASF2, LTOR5, TTHY, ACBP, EPB42, BTF3, CD3Z, BPL1, CLH2, TYB4, SBP1, TNG2, ATRAP, SNAG, RGCC, C42S2, ABRAL) we detected a significant reduction expression between both, Early and Advanced-stage groups respectively, compared to Healthy group (CLH2, TYB4 and CD3z) (**Figure 2F**).

The IPA (**Figure 3**) revealed that the specific protein altered in Early-stage DM1 group were related to immune system activity, specifically to Acute Phase Response Signaling, Complement System and monocytes activation (APOH, ORM1, CD6, C1QC, CD59, RGCC, F2RL3, NXF1, SELL, CD247, HRG, MT-CO1, SEC61A1, SERPINB2, SPTA1, TRADD, S100A11, VKORC1, PPP5C, ALDH3A2, DNAJA1, SELENBP1, CA1, MGST1), trafficking vesicles through Clathrin-mediated Endocytosis signaling (AAK1, AP1S1, APOA2, APOC1, APOC3, CLTCL1, PON1, SH3KBP1) (**Table 2**), metabolism of galactose and sucrose (GALM), including neurological system (ARHGEF6, ARHGEF7, GSK3B, CLTCL1, ITPR1, NAPG, PRKCQ, C1R, GZMK) (**Supplementary Table 2**).

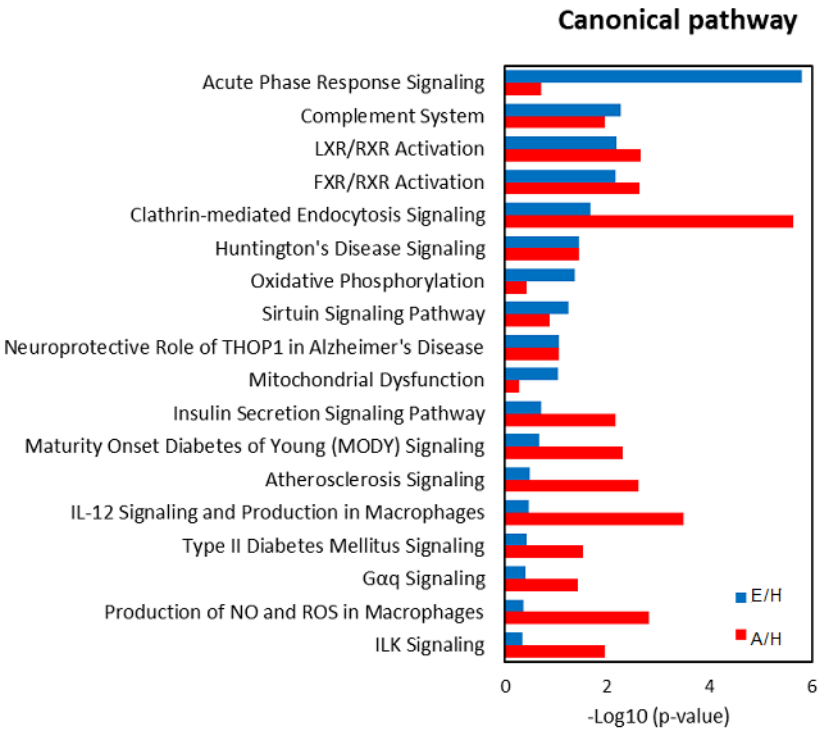


Figure 3. Altered pathways in PBMCs from DM1 Early and DM1 Advanced-stage groups. The IPA shows specific protein altered in the Early-stage DM1 (E-blue) and Advanced-stage DM1 (A-red) group compared to the H. The *p*-values (-log10) obtained by the Kegg Pathway platform.

Table 2. Functional classification of proteins changes due to immunological or inflammatory systems.

T1DM	Diseases or Functions Annotation	p-value	Molecules	Proteins
Early	Binding of monocyte-derived macrophages	0,00014	APOH↑, ORM1↑	2
	Binding of antigen presenting cells	0,00017	APOH↑, CD6↑, ORM1↑	3
	Complement activation	0,00028	C1QC↑, CD59↑, RGCC↓	3
	Aggregation of cells	0,00199	CD6↑, F2RL3↑, NXF1↓, SELL↑	4
	Quantity of leukemia cell lines	0,0027	CD247↓, SELL↑	2
	Cytotoxicity of lymphocytes	0,0032	CD247↓, CD59↑, CD6↑	3
	Adhesion of immune cells	0,00529	APOH↑, CD6↑, ORM1↑, SELL↑	4
	Binding of professional phagocytic cells	0,006	APOH↑, ORM1↑, SELL↑	3
	Binding of myeloid cells	0,00815	APOH↑, ORM1↑, SELL↑	3
	Activation of blood cells	0,00957	CD247↓, CD6↑, F2RL3↑, HRG↑, MT-CO1↑	5
	Inflammation of joint	0,0103	CD247↓, CD6↑, MT-CO1↑, RFLNB↓, RGCC↓, SEC61A1↑, SELENBP1↓, SERPINB2↑, SPTA1↓, TRADD↓	10
	Immune mediated inflammatory disease	0,0139	APOH↑, CD247↓, CD6↓, MT-CO1↑, NXF1↓, RFLNB↓, RGCC↓, S100A11↑, SELL↑ , SERPINB2↑, SPTA1↓, VKORC1↑	12
	Activation of blood platelets	0,0163	F2RL3↑, HRG↑	2
	Cytotoxicity of natural killer cells	0,0188	CD247↓, CD6↑	2
	Apoptosis of T lymphocytes	0,0371	CD247↓, CD59↑	2
	Adhesion of myeloid cells	0,0343	APOH↑, SELL↑	2
	Binding of T lymphocytes	0,0298	CD6↑, SELL↑	2
	Apoptosis of leukocytes	0,0341	CD247↓, CD59↑, PPP5C↓	3
	Stress response of cells	0,0188	ALDH3A2↓, DNAJA1↑	2
	Rheumatic Disease	0,0062	APOH↑, CD247↓, CD6↑, MT-CO1↑, NXF1↓,RFLNB↓, RGCC↓, SEC61A1↑, SELENBP1↓, SELL↑, SERPINB2↑, SPTA1↓, TRADD↓	13
	Systemic autoimmune syndrome	0,0142	CA1↓, CD247↓, CD6↑, MGST1↑, MT-CO1↑, NXF1↓, RFLNB↓, RGCC↓, SEC61A1↑, SELL↑, SERPINB2↑, SPTA1↓	12
	Systemic lupus erythematosus	0,0387	CD247↓, MT-CO1↑, NXF1↓, SELL↑, SERPINB2↑	5
Advanced	Complement activation	0,00003	C1QC↓, C1R↓, C4A/C4B↓	3
	Classical complement pathway	0,00004	C1QC↓, C1R↓	2
	Antibody mediated rejection	0,00032	C1R↓, C4A/C4B↓	2
	Complement component deficiency	0,0004	C1QC↓, C4A/C4B↓	2
	Binding of blood cells	0,00081	APOH↑, C4A/C4B↓, CD6, KNG1↓	4
	Binding of antigen presenting cells	0,00111	APOH↑, CD6↑	2
	Adhesion of blood cells	0,0057	APOH↑, C4A/C4B↓, CD6↑	3
	Cell proliferation of T lymphocytes	0,00734	APOH↑, CD6↑, NCK2↓	3
	Synthesis of prostaglandin E2	0,00498	KNG1↓, MBOAT7↓	2
	Autosomal recessive immunodeficiency	0,00216	C1QC↓, C4A/C4B↓, RAD50↓	3

Protein classification was made with IPA software, showing the most probable functions of the proteins of interest, with at least two proteins related to the function. The table includes the *p*-values, molecule names and protein numbers included per disease or function annotation. Legend, ↑ up-regulated protein, ↓ down-regulated protein.

The Advanced-stage DM1 group presented a differential specific protein expression pattern in the pathway of immune activity and humoral immune response (APOA2, APOC1, APOC3, PON1), and the Clathrin-mediated Endocytosis Signaling pathway (AAK1, AP1S1, APOA2, APOC1, APOC3, CLTCL1, PON1, SH3KBP1), including the IL-12 Signaling and Production in Macrophages and Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages pathways (APOA2, APOC1, APOC3, PON1, PRKCQ) (**Figure 3**, **Supplementary Table 3**), among others such as Atherosclerosis, Metabolism, Signaling Maturity Onset Diabetes of Young (MODY) Signaling, Insulin Secretion Signaling and Type II Diabetes Mellitus Signaling pathways. Significantly, the number of up-regulated proteins in the Advanced-stage DM1 group with a unique profile was STA, CYH4, LFG3, CDK15, PPC5, and FTO, involved mainly in cell cycle, protein modifications and cell signaling (**Supplementary Table 2**).

According to the functional analysis performed with IPA, the protein changes detected in Early or Advanced-stage DM1 *vs* H were related to several significant canonical pathways, like immunological, neurological, cellular trafficking or signaling pathways, among others. Thus, many of the protein changes seen in both stages of DM1, Early and Advanced-stages, were associated with the immune system (31% of them), including immunological or inflammatory functions. However, the Advanced-stage DM1 group shows a significant presence of proteins related to the Clathrin-mediated Endocytosis Signaling pathway and IL-12 Signaling and Production in Macrophages and Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages pathways (mostly APOA2, APOC1, APOC3, PON1, PRKCQ, AAK1, CBL) as shown in **Supplementary Table 2**. These results reflect the presence of differential molecular alterations associated with different stages of DM1, showing an increased profile related to immune system activity.

Differential protein expression pattern in Early and Advanced-stage DM1 groups

Specific differential expressions up- or down-regulated in Early-stage DM1 *vs* Advanced-stage DM1 groups were 3 and 27 proteins respectively (**Figure 4A**). **Figure 4B** showed significant altered proteins in Early and Advanced-stage DM1 groups, with specifically up-regulation: MINY1, UBE3C and PFKAM, with down-regulation profile: C1QC, CO4A, FETUA, HRG, C1R, AKK1, TRIPC, CMC2, NCBP1, CBL, CD6, RAD50, APOH among others.

The differential pathways altered between Early and Advanced-stage DM1 group were involved in immune system activity (C1QC, C1R, C4A/C4B, APOH, CD6, HRG, ITIH4,

CBL, NCK2, KNG1, AAK1) and Clathrin-mediated Endocytosis Signaling pathway (AAK1, CBL), including the metabolic signaling pathways such as oxidative phosphorylation and mitochondrial dysfunction (NDUFA11, SDHC) and neurological system pathways (C1R, KNG1, SDHC). (**Figure 4C**; **Supplementary Table 3**). The protein profiles reflected a significant down or up-regulation in Advanced-stage DM1 *vs* Early-stage DM1 (**Figure 4D**).

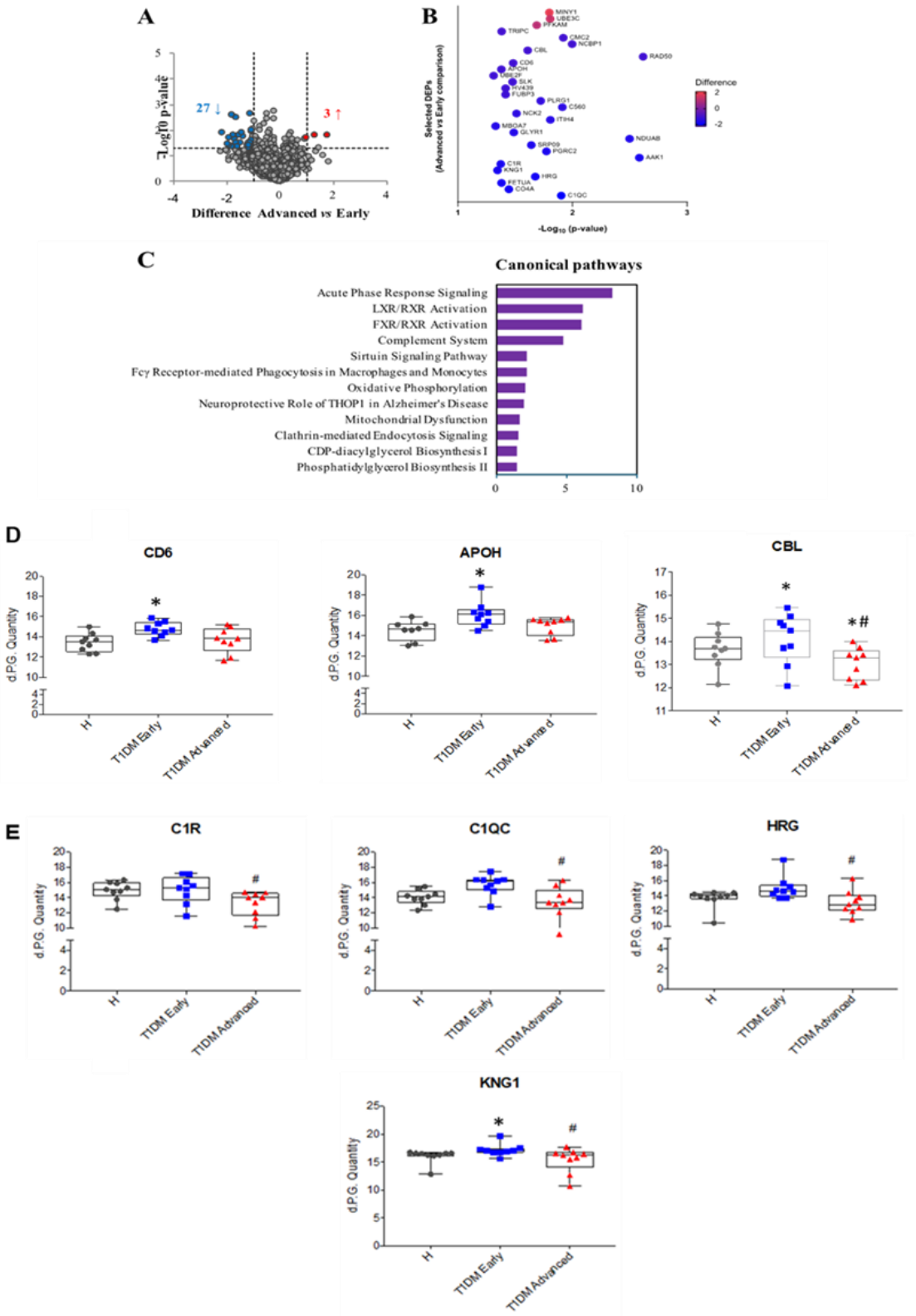


Figure 4: Changes in differential proteins in Early and Advanced-stage DM1 groups. A) Graphical representation of the number of differentially expressed proteins obtained from proteomic analysis in Early-stage DM1 comparing Advanced-stage DM1 group. **B)** Selected DEPs up- or down-regulated in Early-stage DM1 *vs* Advanced-stage DM1. **C)** The IPA shows common canonical pathways in Advance-stage DM1 *vs* Early-stage DM1 group. The p-values (-log10) obtained by the Kegg Pathway platform and the calculated SD are represented. A schematic representation of the changes seen for the common DEPs found **D)** up-regulated in the Advanced-stage DM1 group or **E)** down-regulated are shown, together with graphical representations of the Log2 (LFQ intensities) recorded for selected proteins identified through predictive analysis. **p*-value <0.05.

Early and Advanced-stage DM1 groups present differences in several functional and disease related pathways

The common canonical pathways in Immunity and inflammation processes were increased in the Advanced-stage DM1 group compared to Early-stage DM1 group. In addition, other processes, such as membrane trafficking, metabolic, or signaling pathways, were also found to be commonly linked to the DEPs seen in Early and Advanced-stage DM1 groups *vs* Healthy group (**Figure 5A**; **Supplementary Table 4**).

To analyzes show that IL-12 signaling and production in macrophages is one the most prevalence pathway showing altered proteins. IL-12 serum levels were the target protein selection for validation and association with clinical significance in the Early and Advanced-stage DM1 groups were significantly increased compared to the H group (p<0.001) (**Figure 5B**).

Furthermore, in Early and Advanced-stage DM1 groups, many DEPs were related to lipid metabolism (3% and 21% respectively), and in Advanced-stage group a higher number of DEPs were linked to trafficking vesicle pathways function compared to the Early-stage DM1 group (8,5%, 2% respectively). Remarkably, 1-10% of the altered proteins were also involved in neurological system pathways in each stage of DM1. Regarding the diabetes-associated complications, in Early-stage DM1 4.6% of DEPs were related to ND in Early-stage DM1 group *vs* a 2% in Advanced-stage DM1 group; however, only in Advanced-stage DM1 group, 2% of altered proteins were related to diabetic retinopathy. Indeed, a higher number of proteins related to the cell signaling pathways were found in the differential progression of DM1 groups *vs* H (**Figure 5C**).

The analysis also showed common functional annotations between both stages, and there were several canonical pathways shared among these pathologies, like immunological and inflammatory functions in C1R, C1QC, C4A/B, APOH, CD6, KGN1 and NCK2 (**Figure 5D**) (**Supplementary Table 5**). There were also some common annotations about disease and functions, most of them related to secondary complications to DM1, such as retinopathy like KNG1, C4A/4B, CBL and HRG proteins (**Figure 5E-F**; **Supplementary Table 6**).

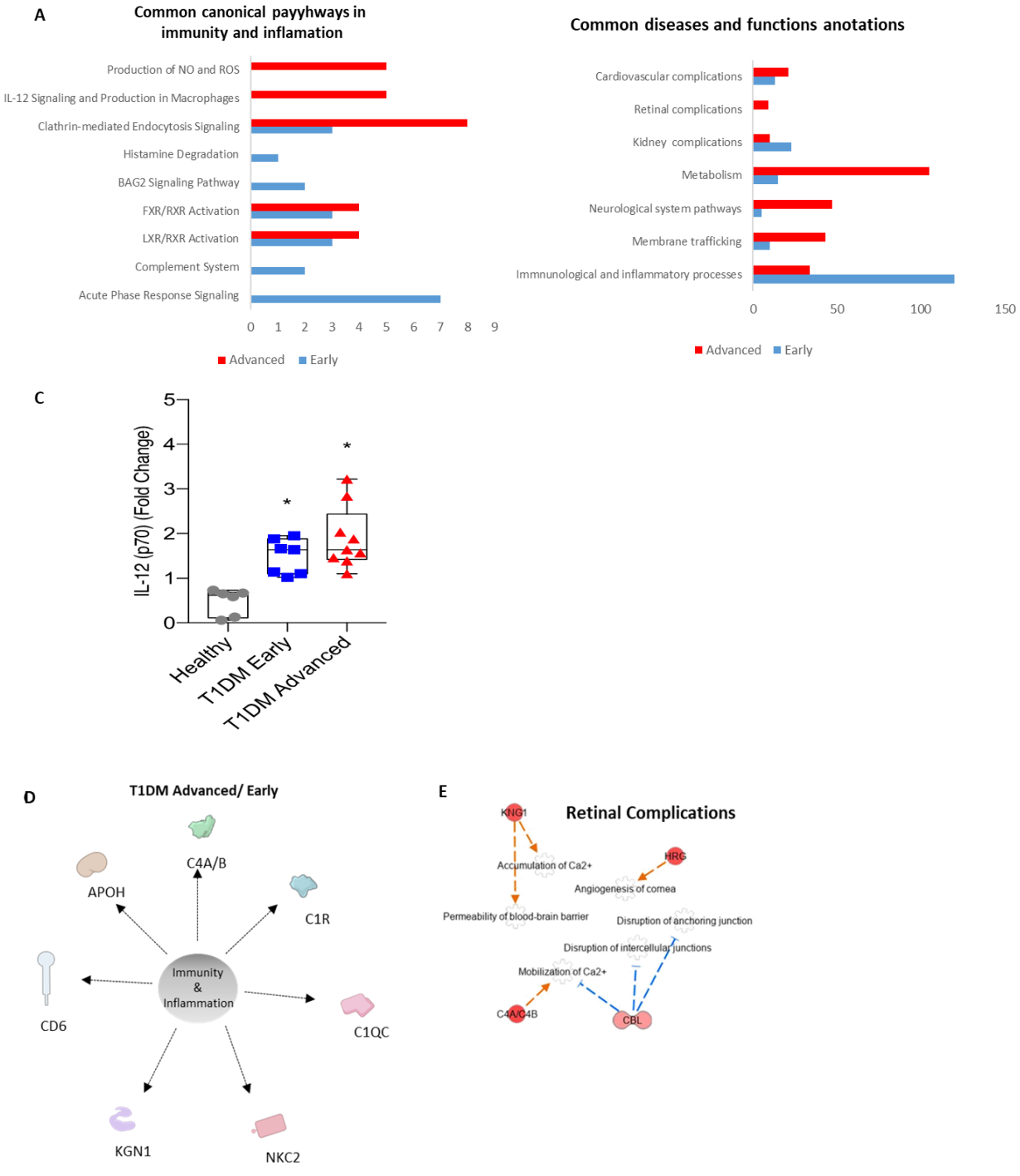


Figure 5: Functional analysis comparison between Early and Advanced-stage DM1 groups. A) Common canonical pathways identified for Early and Advanced-stage DM1 groups. Pathways with more than two significant proteins are shown. The bars showed the number of significantly identified proteins. **B)** Levels of IL-12 in serum from peripheral blood were assayed in patients diagnosed with Early or Advanced-stage DM1 groups, as well as in H IL-12 levels were assayed by the Bio-Plex assay. $^{*}p<0.05$ *vs* H. **C)** Common disease and function annotation between Early and Advanced-stage DM1 groups. Pathways with more than two significant proteins are represented. The bars showed the number of significantly proteins identified. **D)** The IPA functional network including proteins up or down regulated in PBMCs. The chart shows the correlations between the DEPs in the Advanced *vs* Early-stage DM1 groups (compared to H) and different canonical pathways, according to Ingenuity functional assays. **E)** The chart shows the correlations between the number of DEPs in the Advanced-stage DM1 and Early-stage DM1 groups and the disease and functions found by ingenuity for complications associated with DM1, RD (upper chart) and ND (bottom chart).

Clinical features and their correlation with DEPs

In addition to the baseline data presented in **Table 1**, we collected other clinical features of Early and Advanced-stage DM1 group patients based on clinical tests.

In brief, there were no significant differences between the Healthy and Early, Advanced-stage DM1 groups in terms of neutrophil, lymphocyte, monocyte and eosinophil. The data showed a significant difference in both DM1 groups compared to the H group, including glucose, HbA1c, C-peptide and mRNFL. The Early and Advanced-stage groups present significant differences in age, insulin dose and basophils.

Although there were no significant differences in these clinical features between Early and Advanced-stage DM1 groups, the correlation analysis between the glucose, HA1b, and DEPs in **Supplementary Table 7-8** shows that some proteins were associated with more than one clinical feature.

The heatmap representation showed in **Figure 6**, the correlation analysis between SD-OCT values from the Advanced-stage DM1 group and proteins involved in immunological and inflammatory functions and related to secondary complications to DM1, such as retinopathy in the Early-stage group, shows a specific association with the altered protein profile in Early-stage DM1 group and angiography sets values in Advanced-stage DM1 group.

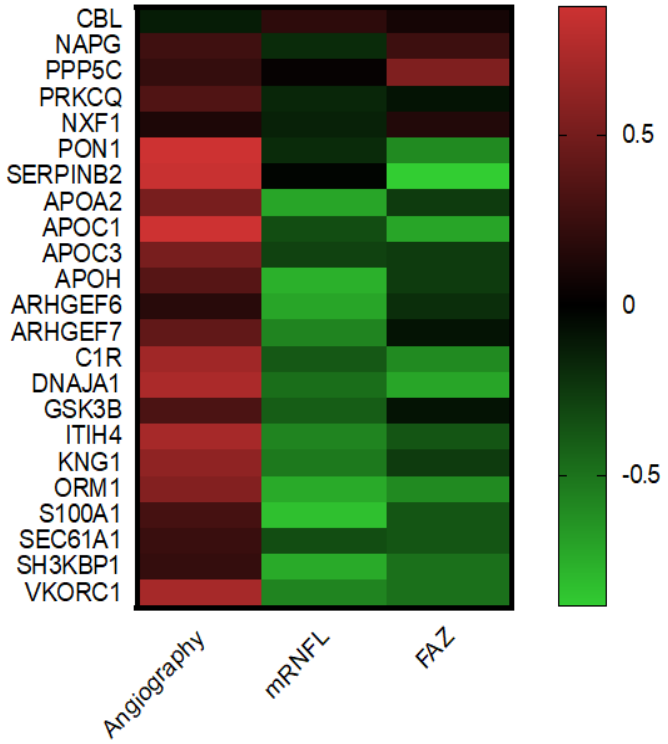


Figure 6: Heat-map of significant modulation of protein expression in Advances-stage DM1 group compared clinical parameters. Between-group clustering heat map altered proteins in the Advanced-stage DM1 group combined with retinal parameters. Proteins were statistically significantly elevated or declined in Advanced-stage DM1 group compared to Healthy controls (p<0.05). Green represents low expression and red represents high expression.

The predictive value of CBL as a differential diagnosis for DM1 immunological status and HRG as a potential biomarker for the diabetic complication's development.

To evaluate the diagnostic efficacy of specific proteins, ROC curves were constructed utilizing the protein common or different protein sets previously identified in **Figure 4** and **Figure 5**. In data obtained from the cohort, proteins like NFX1, PPP5C, and TRADD in the Early-stage DM1 group, APOC1, APOC3 and ARHGEF7 in the Advanced-stage DM1 group showed a significant value of differential prognosis in each DM1 group related to inflammatory status (**Supplementary Table 9**). However, the only significant value with differential prognosis between both DM1 groups, Early and Advanced about inflammatory status with a similar autoimmune profile was CBL, AUC of 0.7901 (95 % CI: 0.559 -1; $p = 0.038$ (Sensitivity: 100% and Specificity: 55.6%), indicating the diagnostic performance of CBL in distinguishing between Early and Advanced-stage DM1 patients (**Figure 7A**).

Regarding associated complications to DM1, proteins like HRG and CBL related to RD showed a significant value of prognosis in Early-stage DM1. The ROC curve depicted the strong discriminatory power of HRG area under the curve [AUC] = 0,8395; $p < 0.015$; 95% CI = (0.637-1.042) Sensitivity: 66.67% and Specificity: 100%) for the potential develop of DM1 complications, such as RD (**Figure 7B**).

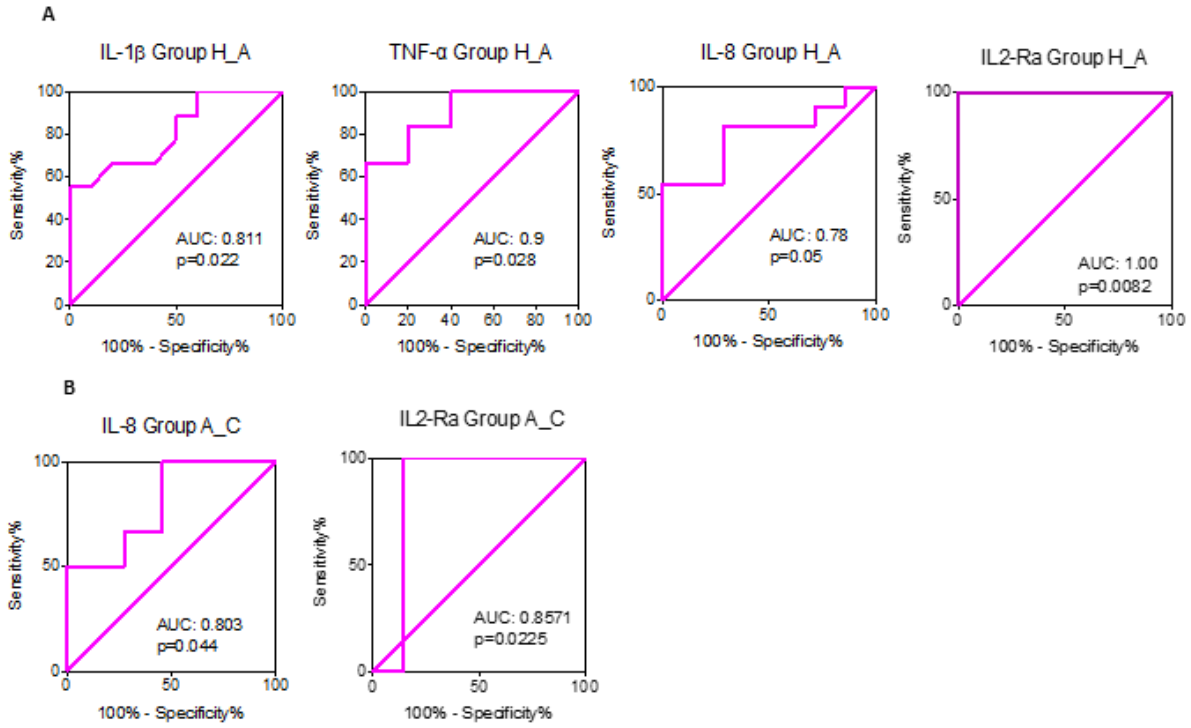


Figure 7: Predicting the prognosis of differential immunological status in DM1 using CBL and HRG protein expression. A) ROC curve of CBL expression protein predicted differential immunological status in Early-stage *vs* Advanced-stage groups. **B)** ROC curves of HRG expression in Early-stage DM1 predicted the potential development of diabetic complications in the Advanced-stage DM1 group.

DISCUSION

At present, autoantibodies against β cell markers (Katsarou et al., 2017), including hyperglycemia levels (Insel et al., 2015) are associated with the DM1 status. This study described as the immune system is involved in common and different signaling pathways during DM1 progression. In both DM1 groups analyzed, different signaling pathways have been associated, which provides a new perspective on the molecular bases underlying the progression of DM1 and its implication on associated complications developing.

The mechanisms implicated in immunological, trafficking system, lipid metabolism and

neurological contexts and the proteins involved, allow the establishment of similar and/or differential profiles in diagnosis, progression and complications of DM1 detection. LQF proteomics approach to identify DEPs in PBMCs from DM1 patients at two different status of disease at ≤12 months and at >12 months, compared to those from Healthy control, discerning potential correlations or difference in both. Into the different or common proteins dysregulated in both analyzed groups, we have identified three potential biomarkers associated to the DM1 progression and the development of diabetic retinopathy, elevated IL-12 levels and CBL and HRG expression since early status.

Diabetes is associated with various factors that contribute to chronic inflammation, including both humoral components and immune cells (Donath & Shoelson, 2011), where the oxidative stress plays a pivotal role in the pathogenesis (Sobhi, 2020), evidencing that reactions often precede the onset of clinical diabetes which may occur many years in advance (Bulek et al., 2012). As an important component of immune, PBMCs reflect immune responses and act as an immunological marker of DM1 status (Axelsson et al., 2008).

The data obtained shows an interaction between immune system modulation, neurological and trafficking vesicle systems pathways associated with DM1 status. The PBMCs analysis contribute to understand the immune and inflammatory context in each DM1 stages and unravel the underlying mechanisms involved.

In agreement with previous studies showing the existence of a differential transcriptional expression profile in PBMCs between Healthy controls and DM1 (Bomprezzi et al., 2003), and our investigation revealed a discernible proteomic profile between individuals afflicted with Advanced-stage DM1 and Healthy group. But the Early-stage DM1 group showed a similar proteomic pattern than Healthy controls.

Early and Advanced-stage DM1 groups share protein expression patterns which are mainly consistent with the immunological processes involved. A similar up-regulated pattern is described in LYAM, ENAM, A1AG1, HEP, PAR4 and CD59 protein. In this sense, immunological system (BT3, PON1, CD3Z, CDV3, CAH1, SNAG, ABRAL, RFLB) and trafficking vesicle (MISSL, TNG2, LTOR5, CLH2, TYB4, C42S2, SPTA1, TRD7), present a similar down-regulation profile, cellular signaling (RAF2, RBP56, ATRAP, RO60) or metabolism (RGCC, BPL1, SBP1, AL3A2, ACBP, EPB42, CYTB) was found.

These data show a specific increase in immunological common proteins with the

detriment of proteins involved mainly in signaling or metabolism processes. Interestingly, these results are according with a specific proteomic expression pattern in different stages of DM1. These findings could contribute to identifying potential protein biomarkers (PAR4 and CLH2A) that are either shared between Early and Advance-stage DM1 or specific to each stage.

Furthermore, the Early-stage group showed a similar number of DEPs than the Advanced-stage group, with the former presenting 68 or 74 DEPs. Regarding the specific distribution of altered proteins, a higher number of up-regulated or down-regulated proteins were detected in the Early or Advanced-stage DM1 group respectively due to discrepancy in the number of dysregulated genes within PBMCs during the progression of DM1. The immunomodulatory phenomenon linked to β-cell destruction contributes to a distinct signature throughout DM1 progression (Van Belle et al., 2011; Van Megen et al., 2017; Von Herrath et al., 2007).

A differential alteration between the Early and Advanced-stage DM1 group in the set of proteins involved in immunological processes has been described. There are more of these proteins in the Early-stage group and with functions in immune processes different from those presented by the proteins identified in the Advanced-stage group. Specifically, during early periods of DM1 development, proteins involved in the activation of B and T cells (CD6, CD59, CD247) are highlighted (Consuegra-Fernández et al., 2018; Dexiu et al., 2022; Ghosh et al., 2015), acute inflammatory response mediated by monocyte populations and macrophage activation (ORM1, HRG, MGST1) (Jones et al., 2005; Thulasingam & Haeggström, 2020; L. Xun Wang et al., 2019), that contribute to the onset of autoimmune response, acute type, the basis for the development of DM1 (Rendra et al., 2019).

These processes are supported by the intervention of protein networks that mediate cellular signaling (PPP5C, SERPINB2, SELENBP1) (Elhodaky & Diamond, 2018; Schroder et al., 2011; Zhang et al., 2023), and contribute to cellular communication in the immune response by activating the system of membrane vesicles that will favour the secretion of inflammatory mediators and generation of the network of inflammatory responses (AAK1, AP1S1, APOA2, APOC1, APOC3, CLTCL1, PON1, SH3KBP1 (Christian et al., 2018; Fekrvand et al., 2022; Hsu et al., 2023; Nahorski et al., 2018; Shin et al., 2021; Shunmoogam et al., 2018).

However, analysis of specific proteins from the Advanced-stage group reveals a decrease in the number of altered proteins related to immune processes, while maintaining the same levels as those involved in endocytosis signaling (AAK1, AP1S1, APOA2, APOC1, APOC3, CLTCL1, PON1, SH3KBP1); in late stages of DM1, immunological activity decreases relative to much more acute initial periods. Thus, the inflammation that accompanies the development of DM1 in advanced stages does not depend on the activation of T and B cell populations, but rather a basal inflammation is detected which is fundamentally macrophage-regulated (Lapenna et al., 2018; Olefsky & Glass, 2009). The proteins involved in neurological processes show a unique pattern in the Early-stage DM1 group, mainly belonging to neuronal signaling pathways (ARHGEF6, ARHGEF7) (Frank & Hansen, 2008), neuropeptide secretion (CLTCL1) (Nahorski et al., 2018), neuroinflammation (ITPR1, GZMK, C1R) (Hoeks et al., 2024; Xie et al., 2021; Xu et al., 2022) and cell signaling (PRKCQ, GSK3B) (Wilda et al., 2001).

The common canonical pathways altered revealed a prevalent association of IL-12 signaling and production in macrophages in DM1, production of NO and ROS and Clatrin-mediated endocytosis signaling in Advanced-stage group generating an inflammatory context. These alterations contribute to the diabetic complication's development. The inflammatory environment presents during DM1 progression has been reported in different studies, where levels of IL-12 are elevated in patients with DM1 in young patients (Ryba-Stanisławowska et al., 2014), aligned with the data obtained in the Early-stage DM1 group. IL-12 represents a functional bridge between the early nonspecific innate resistance and the subsequent antigen-specific adaptive immunity, presenting dual roles in promoting both pro- and anti-inflammation in diabetes.

Recent studies have focused on the relationship between circulating levels of IL-12 and diabetic complications, particularly DM1 patients with cardiovascular autonomic neuropathy exhibit significantly elevated circulating levels of IL-12 compared to healthy individuals (Wegeberg et al., 2020), but other studies support that the varying levels of IL-12 can exacerbate glucose variability, increasing the risk of diabetes complications (Klimontov et al., 2023). In this regard, we have contested that the progression of DM1 is accompanied to increases in the glycated hemoglobin values, contributing to diabetic complications development. IL-12 family cytokines have the potential to not only predict and reflect the severity of diabetes and serve as suitable indicators for estimating the risk

of diabetes complications.

AAK1 participates as an important regulator of amacrine and photoreceptor cells. It modulates interneuron synapse functions (Léger et al., 2018). The down-regulation detected in the specific profile in the DM1 Advance group, contributes to understanding the visual function failure detected in DM1 progression (Arroba et al., 2016), and the downregulation of AAK1 is involved in the decrease of vesicle signaling for transduction signal in visual function (Santos et al., 2023), with potential relationship to the onset of RD. Since there is a differential pattern between the groups, we sought to identify processes related to complications associated with DM1, such as retinopathy and diabetic nephropathy. Although these processes are mostly detected in long-term patients, such as the Advanced-stage DM1 group, the patient's immune system probably contributes to their earlier or later onset, and the degree of severity (Yanxia et al., 2024).

The involvement of the immune system in RD and DN is supported by multiple works that have identified the mechanisms that contribute to the development of complications, as well as description of potential proteins with altered patterns that are linked to pathological processes of the retina (Ma et al., 2024).

Our results identify that KNG1, which encodes for bradykinin protein, participates in the regulation of intracellular calcium levels. The modulation of calcium contributes to retinal inflammation and neovascularization, notably in DR, being a factor known to disrupt the BRB leading to the extravasation of plasma proteins via disrupted tight junctions, stimulation of fluid-phase vesicular transport or the formation of transcellular pores or channels (Catalioto et al., 2015).

In different processes related to RD, the existence of an anti-inflammatory response by the immune system of the retina has been demonstrated, which is subsequently able to turn pro-inflammatory in more advanced stages of the disease (Arroba et al., 2016). In this sense, the altered pattern of expression of HRG, a protein secreted mainly by macrophages with anti-inflammatory activity or M2 (Rolny et al., 2011; Wake, 2022), justified the RD development. Part of this process is mediated by increased vascular development, which allows the recruitment and arrival of these immune cells to the retina (Duh et al., 2017; Grigsby et al., 2014).

HRG has protective effects on vascular barrier function *in vitro* and *in vivo*. Microvascular barrier breakdown is a hallmark of RD. HRG promotes an anti- inflammatory response through regulation of cell shape, spontaneous ROS production in neutrophils, and adhesion of neutrophils to vascular endothelial cells (Gao et al., 2019).The inflammatory response or immunological disease present in the development of complications associated with diabetes may be mediated by the deregulation of C4A/C4B, as indicated by the altered patterns in patients with DM1, identifying a decrease in the Advance-stage DM1 group from the Early-stage DM1 group. Based on our results a specific pattern for C4A/C4B has been identified and mainly enrichment in immunity-related pathways or presented specificity across tissues, kidney- related tissue cells, and kidney single cells, mainly by inhibiting the progress of DN and preventing renal failure (Si et al., 2024).

The *CBL* gene, a part of the Cbl family, encodes the protein CBL which is an E3 ubiquitin-protein ligase involved in cell signalling and protein ubiquitination. Regarding the diabetes mellitus context, the enrichment analysis revealed that the ubiquitinated proteins are mostly linked to tight junctions, oxidative phosphorylation, and thermogenesis. CBL is required for anti-neovascularization in pathological retinal process (Chen et al., 2020).

As shown by the enrichment in diabetic complications pathways, our results reveal a pattern of down-regulated expression for CBL in both groups of DM1, being greater in the Advanced-stage group, and signifying between both stages of evolution of DM1. Therefore, it contributes to increased vascularization, loss of tight junctions and induction of oxidative stress pathways that add to the inflammatory context of DM1 and development of RD.

In conclusion, our data are aligned with those shown in recent studies where they determined that the proteins regulated in DM1 relate to complement activation, lipid metabolism and immune response (Sarkar et al., 2023).

The approach in the temporal course of DM1, between the Early and Advanced-stage groups, allows to establish differences in regulated proteins, and determine prognostic biomarkers in the development of associated complications. Biomarkers analyzed in two DM1 progression groups, Early and Advanced-stages, highlight alterations in specific biological processes in DM1, including complement, lipid metabolism, and immune response pathways, and may have the potential for further use in the clinic as prognostic or diagnostic assays. The identification of specific expression patterns for common

proteins in DM1 groups progression support the underlying mechanisms involved in the immune response are linked to the development of various immunological and immune complications, accompanied by IL-12 Signaling and Production in Macrophage pathways dysregulation. Thus, our results show that one of the common proteins for DM1, CBL is a potential biomarker differentiating between both DM1 status according to immune status, and specific profile in CBL and HRG in an early state of DM1 progression contributes to the prognosis of RD in advance states.

STUDY LIMITATIONS

A limitation of our study is the low number of samples analyzed, it would be necessary to validate the new biomarkers in larger cohorts and with stratification according to their inflammatory status.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

To gain access to the supplementary tables (1-6) from the article use this link:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1FF5iMaj-gkFmgM8dbiN6SWY2mUrvrosr/edit?usp=drive_link&ouid=110944089378164823452&rtpof=true&sd=true

Supplementary Table 7: Clinical features in the DM1 groups and their correlation with DEPs.

Proteins	Clinical data	Spearman´s Rho (ρ)	*p*-value
AAK1	Glucose	0.667	0.050
CA1	Glucose	-0.767	0.016
	ACRU	-0.767	0.016
CBL	Uric acid	0.881	0.004
	Glucose	0.733	0.025
CD247	Glucose	0.767	0.016
	ACRU	0.750	0.020
DNAJA1	Uric acid	-0.952	<0.001
	Insuline dose	-0.689	0.040
F2RL3	Insuline dose	0.740	0.023
	HbA1c	-0.857	0.014
HRG	Glucose	-0.733	0.025
	ACRU	-0.683	0.042
	Glucose	0.667	0.050
PPP5C	HbA1c	0.786	0.036
SEC61A1	Glucose	0.667	0.050
SH3KBP1	ACRU	0.667	0.050
	Uric acid	-0.762	0.028
SPTA1	HbA1c	-0.786	0.036
	HbA1c	0.821	0.023

ACRU: albumin to creatinine ratios urine, HbA1c: glycosylated hemoglobin levels. The correlation coefficient is indicated as Spearman´s Rho (ρ). $p \leq 0.05$

Supplementary Table 8: Clinical features in Advance-stage DM1 and their correlation with DEPs.

Proteins	Clinical data	Spearman´s Rho (*ρ*)	*p*-value
APOA2	mRNFL	-0.714	0.047
APOC1	Angiography	0.878	0.004
APOH	mRNFL	-0.762	0.028
APOC3	Insuline dose	-0,795	0.010
ARGGEF6	mRNFL	-0.714	0.047
ARGGEF7	Uric acid	-0.706	0.034
DNAJA1	Angiography	0.732	0.039
ITIH4	mRNFL	0.708	0.050
NXF1	Uric acid	-0.706	0.034
ORM1	mRNFL	-0.738	0.037
PON1	Angiography	0.878	0.004
PPP5C	Uric acid	-0.773	0.015
S100A1	mRNFL	-0.833	0.010
SEC61A1	Uric acid	0.782	0.013
	Glucose	0.800	0.010
SERPINB2	Angiography	0.854	0.007
	FAZ	-0.886	0.019
SH3KBP1	mRNFL	-0.738	0.037
VKORC1	Angiography	0.708	0.050

mRNFL: macular retinal nerve fibre layer, FAZ: foveal avascular zone HbA1c: glycosylated hemoglobin levels. The correlation coefficient is indicated as Spearman´s Rho (ρ). $p \leq 0.05$

-**Supplementary Table 9. ROC analysis of proteins in DM1 and Healthy groups**. Healthy vs Early-stage, Healthy vs Advanced-stage and Early-stage vs Advanced-stage comparisons of common dysregulated proteins between groups. AUC= Area under the curve ROC and 95% confidence intervals

T1DM Early *vs* Healthy					T1DM Advanced *vs* Healthy					T1DM Advanced *vs* T1DM Early				
Proteins	AUC (95% CI)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	*p*-value	Proteins	AUC (95% CI)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	*p*-value	Proteins	AUC (95% CI)	Sensitivity (%)	Specificity (%)	*p*-value
ALDH3A2	0.802 (0.591-1)	77.8	77.8	0.031	AP1S1	0.802 (0.582-1)	88.9	55.6	0.031	AAK1	0.954 (0.776-1)	88.9	88.9	0.003
CA1	0.790 (0.566-1)	77.8	55.6	0.038	APOA2	0.802 (0.573-1)	77.8	77.8	0.031	APOH	0.778 (0.552-1)	88.9	66.7	0.047
NAPG	0.827 (0.634-1)	77.8	77.8	0.019	**APOC1**	**0.864 (0.694-1)**	**77.8**	**66.7**	**0.009**	C1QC	0.840 (0.645-1)	88.9	66.7	0.015
NXF1	**0.975 (0.914-1)**	**100**	**77.8**	**0.001**	**APOC3**	**0.914 (0.780-1)**	**88.9**	**66.7**	**0.003**	C1R	0.802 (0.584-1)	100	66.7	0.031
PPP5C	**0.827 (0.634-1)**	**100**	**55.6**	**0.019**	**ARHGEF7**	**0.840 (0.650-1)**	**77.8**	**66.7**	**0.015**	**CBL**	**0.790 (0.559-1)**	**100**	**55.6**	**0.038**
RGCC	0.889 (0.684-1)	88.9	100	0.005	C1R	0.852 (0.664-1)	100	66.7	0.012	CD6	0.790 (0.575-1)	77.8	66.7	0.038
SELENBEP1	0.790 (0.575-1)	88.9	66.7	0.038	CA1	0.815 (0.580-1)	77.8	100	0.024	SDHC	0.926 (0.805-1)	100	55.6	0.002
SERPINB2	0.790 (0.561-1)	88.9	66.7	0.038	CD247	0.926 (0.805-1)	88.9	77.8	0.002					
SPTA1	0.877 (0.716-1)	88.9	55.6	0.07	CLTCL1	0.889 (0.702-1)	88.9	88.9	0.005					
TRADD	**0.877 (0.97-1)**	**88.9**	**77.8**	**0.07**	GSK3B	0.938 (0.832-1)	100	66.7	0.002					
APOH	0.790 (0.575-1)	88.9	55.6	0.038	NAPG	0.815 (0.616-1)	77.8	66.7	0.024					
C1QC	0.864 (0.671-1)	88.9	77.8	0.009	NCK2	0.852 (0.673-1)	88.9	55.6	0.012					
CD59	0.901 (0.761-1)	100	66.7	0.004	PON1	0.914 (0.749-1)	88.9	100	0.003					
CD6	0.877 (0.709-1)	88.9	77.8	0.007	RGCC	0.889 (0.684-1)	88.9	100	0.005					
DNAJA1	0.926 (0.781-1)	88.9	100	0.002	SELENBEP1	0.852 (0.664-1)	88.9	66.7	0.012					
GALM	0.778 (0.545-1)	88.9	55.6	0.047	SH3KBP1	0.840 (0.648-1)	100	66.7	0.015					
HRG	0.827 (0.624-1)	77.8	77.8	0.019	CD59	0.887 (0.716-1)	88.9	66.7	0.007					
ITIH4	0.938 (0.827-1)	88.9	88.9	0.002	F2RL3	0.864 (0.688-1)	100	66.7	0.009					
KNG1	0.901 (0.716-1)	88.9	100	0.004										
MGST1	0.852 (0.664-1)	88.9	66.7	0.012										
ORM1	0.815 (0.606-1)	88.9	77.8	0.024										
S100A1	0.852 (0.664-1)	88.9	77.8	0.012										
SDHC	0.988 (0.949-1)	100	88.9	<0.001										
SELL	0.852 (0.676-1)	100	55.6	0.012										
VKORC1	0.778 (0.557-0.9)	100	55.6	0.047										

6. Discusión General

Los diferentes estudios abordados en la presente tesis doctoral son fundamentales para comprender mejor la progresión de la DM1 y sus complicaciones asociadas desde una perspectiva inmunológica, contexto inflamatorio, así como proteómico. La combinación de análisis de mediadores inflamatorios, perfil proteómico de PBMCs y el estudio poblacional de células inmunes han permitido el desarrollo de una visión lo más íntegra posible de los mecanismos inmunes que subyacen a la DM1 y sus complicaciones secundarias.

El primer estudio se centra en el análisis del perfil dinámico de citoquinas en el suero de pacientes con diferentes tiempos de evolución en comparación con el perfil de individuos sanos, permitiéndonos identificar mediadores inflamatorios que sean clave con el desarrollo de la RD. El segundo estudio, por su parte, profundiza en el análisis proteómico de las PBMCs, revelando la existencia de una expresión diferencial de proteínas que potencialmente podrían indicar la progresión de complicaciones secundarias. El tercer estudio, pone el foco en las diferentes poblaciones y subpoblaciones celulares que componen las PBMCs de pacientes a lo largo de la progresión de la enfermedad e individuos sanos, además de la expresión de diferentes genes inductores de las diversas respuestas inmunes responsables del componente inflamatorio. La combinación de estos tres estudios con sus diversos enfoques, tratan de mostrarnos una visión integral de los mecanismos inmunes y celulares que subyacen a la DM1 y además contribuir a la identificación de potenciales biomarcadores que podrían en un futuro ayudarnos a mejorar nuestras herramientas de diagnóstico temprano, prevención y fomentar el desarrollo de nuevas estrategias terapéutica.

Uno de los principales hallazgos del primer estudio es la relación entre la inflamación crónica y la progresión de la DM1 mediante la caracterización de los perfiles de varios mediadores inflamatorios (citoquinas, quimioquinas…) en los distintos grupos de pacientes junto con los individuos sanos revelando un desequilibrio inflamatorio en los pacientes. La inflamación crónica que presentan los afectados de DM1 juega un papel crucial en la progresión de esta, ya que la respuesta autoinmune mediada por linfocitos T y B contribuye a la destrucción de las células β pancreáticas productoras de la insulina puede verse modulada por el contexto inflamatorio en el que se desarrolla la respuesta. (Tabakoglu & Celik, 2024). Este hecho puede justificar las diferencias clínicas encontradas entre paciente en cuanto al desarrollo y agresividad de la enfermedad. En

nuestro estudio hemos evidenciado que citoquinas proinflamatorias como la IL-1β, TNF-α e IFN-γ, se encuentran elevadas en los estadios iniciales de la DM1 respecto a los individuos sanos y a los estadios más tardíos que puede deberse a que aún se está llevando a cabo la respuesta autoinmune frente a remanentes de células β o a un pobre control de la diabetes. Estos marcadores proinflamatorios son partícipes en la disrupción de la BHR promoviendo que sea más fácil el desarrollo de RD con el tiempo (Jin et al., 2024; Mason et al., 2022).

Además, mediante la realización de OCTs en pacientes incluidos en el programa de detección temprana de RD, hemos podido observar que, incluso en el momento inicial de la realización del examen, existe una pérdida progresiva del grosor de la retina, así como la presencia de HRFs en la retina (Huang et al., 2022; Midena et al., 2018), que podría ser indicativo de eventos asociados a la presencia de microglía activada. Estos datos de la estructura de la retina junto con los obtenidos de las citoquinas nos indican que los niveles elevados de IL-8, IL-2ra e IL-17 e IL-12(p70) presentes en estos pacientes junto con su correlación con los cambios en el grosor de la retina, nos muestran el potencial de estos como biomarcador para la RD, ya que estas citoquinas y en particular IL-17 e IL-12(p70) se ha demostrado que juegan un papel clave en el desarrollo de un microambiente proinflamatorio en la retina lo que conlleva a la degeneración de esta (Carmichael et al., 2022; J. Chen et al., 2023; Semeran et al., 2013; Shi et al., 2023).

Por otro lado, este estudio muestra que, citoquinas antiinflamatorias siguen patrones distintos: aquellas que se mantienes con elevados niveles en todos los estadios de la enfermedad como IL-13 e IL-1ra, y aquellas que sólo presentan niveles aumentados en un momento determinado de la evolución de la enfermedad, entre 1 y 3 años, como LIF e IL-4. Los niveles elevados de IL-13 e IL-1ra en nuestra cohorte puede estar debida a los eventos hiperglucémicos y a la inhibición de eventos proinflamatorios (Scuderi et al., 2015). Il-4 presenta una producción deficiente en los estadios iniciales lo cual podría promover el desarrollo de la DM1 y su aumento nos indica que se está produciendo un cambio para la inducción de la respuesta antiinflamatoria (Asif et al., 2025; Berman et al., 1996; Cattin-Roy et al., 2024; Suarez-Pinzon & Rabinovitch, 2021).

El segundo estudio, centrado en el análisis proteómico de las PBMCs en pacientes con DM1 comparativamente con individuos sanos, nos muestra la existencia de diferencias significativas en la expresión de distintas proteínas, implicadas en varios procesos

biológicos, diferencialmente entre los individuos sanos y los diabéticos, así también en la progresión de la enfermedad, evento que ya ha sido reportado en varios estudios (Bomprezzi et al., 2003; Van Belle et al., 2011; von Herrath et al., 2007). En particular, se observó que, las proteínas implicadas en procesos inmunológicos compartían un patrón de expresión en ambos grupos de estudio. Mayoritariamente estas proteínas presentan un perfil con menor expresión regulando la señalización y procesos metabólicos; mientras que, las proteínas con mayores niveles de expresión están implicadas en procesos inflamatorios.

Analizando las proteínas con patrones alterados de expresión y que difieren entre los grupos de pacientes con DM1, Early y Advanced se pudo observar cómo en periodos tempranos de la evolución de la DM1, se refleja una mayor expresión de CD6 y CD59, (Consuegra-Fernández et al., 2018; Dexiu et al., 2022) así como ORM1 y HRG vinculadas a la activación de linfocitos T y B y activación de macrófagos respectivamente (Jones et al., 2005; Thulasingam & Haeggström, 2020; Wang et al., 2019). Es destacable, la detección de patrones alterados en la expresión de PPP5C AAK1 y APOA2, entre otras, las cuales ven reducidas sus niveles de expresión respecto a los individuos sanos, estas están implicadas en los procesos de tráfico de vesículas y señalización celular, lo que favorece aún más la secreción de mediadores inflamatorios lo cual acaba promoviendo la insulitis y consecuente destrucción de las células β pancreáticas (Christian et al., 2018; Elhodaky & Diamond, 2018; Hsu et al., 2023; Zhang et al., 2023).

Sin embargo, los análisis obtenidos del patrón de proteínas desreguladas en el grupo Advanced o de larga evolución de la DM1, refleja una menor expresión de proteínas relacionadas con procesos biológicos, como la endocitosis y tráfico de vesículas. Relacionándose con la presencia de une estado proinflamatorio crónico, mediado por macrófagos, e independiente de la activación de células inmunológicas y debido al proceso autoinmune en sí (Lapenna et al., 2018; Olefsky & Glass, 2009).

La detección de perfiles específicos en proteínas como CBL e HRG, así como su relación con la producción de citoquinas implicadas en RD y/o ND, permite determinar la relación de la progresión de la DM1 y desarrollo de complicaciones asociadas, perfilando la utilidad de estas proteínas como potenciales biomarcadores (S. Chen et al., 2020; Gao et al., 2019).

El tercer estudio nos proporciona una visión integral del paisaje inmune periférico durante

la progresión de la DM1, destacando alteraciones significativas en la composición de las subpoblaciones celulares y en la expresión de genes clave asociados a procesos inflamatorios y de regulación de estos. A través de la citometría de flujo y el análisis de los transcritos vinculados con la producción de respuestas inflamatorias de las PBMCs, se han identificado patrones inmunes específicos que permiten distinguir entre las etapas temprana y avanzada de la enfermedad, con implicaciones tanto diagnósticas como terapéuticas.

Los resultados del estudio nos muestran que la progresión de la DM1 está asociada a un proceso de activación inmune crónica, que, a lo largo del curso temporal presenta la participación unos subtipos celulares inmunes u otros, todo ello condicionado tanto por el contexto inflamatorio circundante, como por la capacidad de modulación de dicha respuesta. Esto se evidencia por el aumento de las células T $CD4^+$, especialmente de las células memoria y la progresiva disminución de las células T $CD8^+$ y NK, lo que sugiere una desregulación funcional de los mecanismos citotóxicos implicados en el control de la respuesta autoinmune (Luo et al., 2025). Este desequilibrio podría facilitar la persistencia del ataque inmune que sufren las células beta pancreáticas y progreso de la enfermedad (Skowera et al., 2015; Vignali et al., 2018).

En relación con el componente inflamatorio, se detecta una respuesta bifásica por de las células Th17, que refleja una potencial respuesta inhibitoria sobre la inflamación temprana, que progresivamente va perdiendo eficiencia. De forma paralela, el aumento de los factores de transcripción FoxP3 y RORγt, implicados en la diferenciación de células Treg y Th17; junto con la expresión sostenida de mediadores inflamatorios como TNF e IFNG, respaldan la hipótesis de coexistencia de señales proinflamatorias y reguladoras, que a su vez están respaldadas por la detección de citoquinas con perfiles proinflamatorios en suero de pacientes en las distintas etapas de la DM1 (Teniente-Serra et al., 2021).

El análisis de marcadores antiinflamatorios corroboró la detección de una respuesta temprana, mediante la inducción de ARG1 y HMOX1, convirtiéndose ambas en la piedra angular de posibles tratamientos en las etapas iniciales de la DM1 (Husseini et al., 2015). Nuestro estudio demostró la capacidad de inmunomodular la respuesta inflamatoria presente en PBMCs de pacientes con DM1, utilizando moléculas sintéticas bioinspiradas en estructuras naturales, como es el M9 (Martín-Loro et al., 2024; Ortega et al., 2022).

Este resultado sugiere que el M9 y compuestos análogos podrían ser prometedores para la modulación de la respuesta inmune en pacientes de recién diagnóstico, mejorando su pronóstico y evolución.

Dado que la inflamación se ha demostrado que juega un papel crucial en el desarrollo y progresión de las complicaciones secundarias, estrategias dirigidas a la reducción de la actividad, inmune como agentes antiinflamatorios o inmunomoduladores, podrían ser una alternativa viable para el retraso en la progresión de la DM1 y reducir el riego de padecimiento de complicaciones mejorando la calidad de vida de los pacientes.

Todos estos hallazgos subrayan la importancia del sistema inmune en el desarrollo de la RD, abriendo las puertas de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a modular la respuesta inflamatoria que los pacientes sufren. Si bien a pesar de los importantes avances que se han mostrado en la presente tesis doctoral, existen ciertas limitaciones de las cuales debemos ser conscientes. En primer lugar, a pesar de que se identifican varios potenciales biomarcadores, estos deben ser hallados y validados en más estudios y con el uso de cohortes más amplias y heterogéneas para poder así confirmar su aplicabilidad al ámbito clínico. Asimismo, la interacción de los procesos inflamatorios con otros factores de riesgo en la progresión de la DM1 requiere de una investigación más exhaustiva que sea capaz de discernir el impacto que tiene cada uno de estos en la fisiopatología de la enfermedad.

7. Resumen y Conclusiones de Resultados

Resumen de resultados

En esta tesis doctoral se demuestra que la DM1 en adultos cursa con una alteración progresiva del sistema inmunitario periférico, observable desde las fases tempranas de la enfermedad. A nivel de citoquinas, se evidencia un desequilibrio entre mediadores proinflamatorios (IL-1β, TNF-α, IL-8, IL-17) y antiinflamatorios (IL-4, IL-13, LIF, IL-1Ra), que no solo contribuye a la progresión autoinmune, sino que también se asocia al desarrollo de complicaciones como la retinopatía diabética.

El análisis proteómico revela la existencia de una firma inmunitaria común en pacientes con DM1, con diferencias específicas según el estadio de la enfermedad, destacando proteínas implicadas en endocitosis mediada por clatrina, activación inmune y metabolismo lipídico. Proteínas como CBL permiten discriminar entre fases tempranas y avanzadas, mientras que HRG, KNG1, C4A/C4B y AAK1 se asocian al daño en retina y riñón, posicionándose como potenciales biomarcadores y dianas terapéuticas.

Desde el punto de vista celular y transcripcional, la progresión de la DM1 se acompaña de cambios en las subpoblaciones inmunes, con aumento de linfocitos T $CD4^+$ y células B, y disminución de células NK y $CD8^+$. Estos cambios se correlacionan con una polarización inmunitaria proinflamatoria temprana, coexistiendo con una respuesta antiinflamatoria compensatoria. Finalmente, el tratamiento in vitro con el compuesto M9 demuestra una capacidad significativa para reprogramar la respuesta inmune, reduciendo mediadores proinflamatorios y potenciando vías antiinflamatorias, lo que respalda su potencial terapéutico en las fases iniciales de la DM1.

Conclusiones

Estudio I

1. Durante la progresión de la diabetes tipo 1, se producen cambios importantes en las poblaciones de células inmunes periféricas, como aumentos en los linfocitos T CD4+, especialmente la subpoblación de los linfocitos T $CD4^+$ memoria, así como linfocitos B, y una disminución de células NK y linfocitos T CD8+, lo que refleja un estado de activación inmune persistente.

2. En pacientes en etapas tempranas presentan una elevada respuesta antiinflamatoria. Caracterizada por la expresión de genes como *HMOX1*, *ARG1*, *FOXP3* y *RORCT*, sin embargo, la expresión de genes proinflamatorios como *TNF* o *IFNG* se mantienen. Esto sugiere que los procesos antiinflamatorios tempranos actúan como mecanismos compensatorios frente al inicio de los procesos autoinmunes, pero que dicho mecanismo desaparece conforme progresa la diabetes, dando lugar a una respuesta inflamatoria crónica.

3. El tratamiento in vitro de células inmunes periféricas de pacientes en etapas tempranas de la diabetes mellitus tipo 1 con el compuesto sintético M9, demostró un efecto inmunomodulador, evidenciado por la reducción en la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL1B o IL6, así como por el aumento en la expresión de mediadores antiinflamatorios como HMOX e ARG1, lo que resalta su potencial terapéutico para modular la respuesta inmune en las fases iniciales de la diabetes.

Estudio II

1. Existe un desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias e antiinflamatorias en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1. Citoquinas como la IL-1β, TNF-a e IL-8 presentan un alto potencial como dianas terapéuticas en los estadios iniciales de la diabetes, mientras que IL-17 podría considerarse una diana relevante para la prevención del desarrollo de retinopatía diabética ya que está implicada en los procesos de disrupción de la barrera hematorretiniana.

2. Las estrategias terapéuticas deberían incorporar un enfoque dual, orientado a la inhibición los procesos proinflamatorios y el fortalecimiento de la respuesta antiinflamatoria, como ocurre con citoquinas tale como LIF, IL-1, IL-13 e IL-1Ra en los momentos críticos del desarrollo de la diabetes. Este enfoque permitiría un control de la progresión de la enfermedad y del desarrollo de complicaciones.

Estudio III

1. Las células inmunes periféricas de los grupos Early y Advanced de pacientes con diabetes mellitus tipo 1, comparten una firma proteómica común, sin embargo, presentan diferencias en la expresión de diversas proteínas implicadas en procesos como tráfico vesicular, la activación inmune, el metabolismo lipídico y la producción de IL-12, entre otros. Estas diferencias indican una transición desde una inmunidad temprana mediada por linfocitos hacia una respuesta y regulada por macrófagos en las etapas avanzadas de la enfermedad.

2. Varias de las proteínas identificadas presentan un alto potencial para su uso clínico con fines pronósticos, como es el caso de CBL, que nos permite discernir entre los estados Early y Advanced. Por su parte, HRG es una proteína asociada al desarrollo de complicaciones secundarias, como la retinopatía y nefropatía diabética, lo que la convierte en un candidato relevante para su detección temprana. Otras proteínas, como KNG1, C4A/C4B o AAK1, participan en procesos fisiopatológicos en la retina y el riñón, por lo que podrían considerarse potenciales dianas terapéuticas para este tipo de complicaciones.

8. Bibliografía

Abdelsamed, H. A., Zebley, C. C., Nguyen, H., Rutishauser, R. L., Fan, Y., Ghoneim, H. E., Crawford, J. C., Alfei, F., Alli, S., Ribeiro, S. P., Castellaw, A. H., McGargill, M. A., Jin, H., Boi, S. K., Speake, C., Serti, E., Turka, L. A., Busch, M. E., Stone, M., … Youngblood, B. (2020). Beta cell-specific CD8+ T cells maintain stem cell memory-associated epigenetic programs during type 1 diabetes. *Nature Immunology*, *21*(5), 578–587. https://doi.org/10.1038/s41590-020-0633-5

Aboelnazar, S., Ghoneim, H., Moaaz, M., Bahgat, E. T., & Shalaby, T. (2021). Low-dose interleukin-2-loaded nanoparticle effect on NK and T-reg cell expression in experimentally induced type 1 diabetes mellitus. *Przeglad Gastroenterologiczny*, *16*(1), 67–82. https://doi.org/10.5114/pg.2021.104737

Acevedo-Calado, M. J., Pietropaolo, S. L., Morran, M. P., Schnell, S., Vonberg, A. D., Verge, C. F., Gianani, R., Becker, D. J., Huang, S., Greenbaum, C. J., Yu, L., Davidson, H. W., Michels, A. W., Rich, S. S., & Pietropaolo, M. (2019). Autoantibodies directed toward a novel IA-2 variant protein enhance prediction of type 1 diabetes. *Diabetes*, *68*(9), 1819–1829. https://doi.org/10.2337/db18-1351

Acevedo-Calado, M., James, E. A., Morran, M. P., Pietropaolo, S. L., Ouyang, Q., Arribas-Layton, D., Songini, M., Liguori, M., Casu, A., Auchus, R. J., Huang, S., Yu, L., Michels, A., Gianani, R., & Pietropaolo, M. (2017). Identification of unique antigenic determinants in the amino terminus of IA-2 (ICA512) in childhood and adult autoimmune diabetes: New biomarker development. *Diabetes Care*, *40*(4), 561–568. https://doi.org/10.2337/dc16-1527

Ahmad, J. (2016). The diabetic foot. In *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* (Vol. 10, Issue 1, pp. 48–60). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.dsx.2015.04.002

Ajendra, J., Berbudi, A., Hoerauf, A., & Hübner, M. P. (2016). Combination of worm antigen and proinsulin prevents type 1 diabetes in NOD mice after the onset of insulitis. *Clinical Immunology*, *164*, 119–122. https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.02.005

Akkaya, M., Kwak, K., & Pierce, S. K. (2020). B cell memory: building two walls of protection against pathogens. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 20, Issue 4, pp. 229–238). Nature Research. https://doi.org/10.1038/s41577-019-0244-2

Alhamar, G., Falluca, S., Pieralice, S., Valente, L., & Pozzilli, P. (2023). 1492-P: IL-8/CXCL8 May Identify a New Type 1 Diabetes Endotype. Diabetes, 72(Supplement_1), 1492-P. https://doi.org/10.2337/db23-1492-P

Amanna, I. J., & Slifka, M. K. (2010). Mechanisms that determine plasma cell lifespan and the duration of humoral immunity. In *Immunological Reviews* (Vol. 236, Issue 1, pp. 125–138). https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00912.x

Amorim, M., Martins, B., Caramelo, F., Gonçalves, C., Trindade, G., Simão, J., Barreto, P., Marques, I., Leal, E. C., Carvalho, E., Reis, F., Ribeiro-Rodrigues, T., Girão, H., Rodrigues- Santos, P., Farinha, C., Ambrósio, A. F., Silva, R., & Fernandes, R. (2022). Putative Biomarkers in Tears for Diabetic Retinopathy Diagnosis. *Frontiers in Medicine*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmed.2022.873483

Arif, S., Gibson, V. B., Nguyen, V., Bingley, P. J., Todd, J. A., Guy, C., Dunger, D. B., Dayan, C. M., Powrie, J., Lorenc, A., & Peakman, M. (2017). β-cell specific T-lymphocyte response has a distinct inflammatory phenotype in children with Type 1 diabetes compared with adults. *Diabetic Medicine*, *34*(3), 419–425. https://doi.org/10.1111/dme.13153

Aronson, J. K., & Ferner, R. E. (2017). Biomarkers—a general review. In *Current Protocols in Pharmacology* (Vol. 2017, pp. 9.23.1-9.23.17). Blackwell Publishing Inc. https://doi.org/10.1002/cpph.19

Arroba, A. I., Alcalde-Estevez, E., García-Ramírez, M., Cazzoni, D., de la Villa, P., Sánchez-Fernández, E. M., Mellet, C. O., García Fernández, J. M., Hernández, C., Simó, R., & Valverde, Á. M. (2016). Modulation of microglia polarization dynamics during diabetic retinopathy in db/db mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1862*(9), 1663–1674. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.05.024

Asif, R., Khalid, A., Mercantepe, T., Klisic, A., Rafaqat, S., Rafaqat, S., & Mercantepe, F. (2025). Role of Interleukins in Type 1 and Type 2 Diabetes. In *Diagnostics* (Vol. 15, Issue 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/diagnostics15151906

Axelsson, S., Faresjö, M., Hedman, M., Ludvigsson, J., & Casas, R. (2008). Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells are suitable for the assessment of immunological markers in type 1 diabetic children. *Cryobiology*, *57*(3), 201–208. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.08.001

Azizi, G., Pouyani, M. R., Abolhassani, H., Sharifi, L., dizaji, M. Z., Mohammadi, J., Mirshafiey, A., & Aghamohammadi, A. (2016). Cellular and molecular mechanisms of immune dysregulation and autoimmunity. In *Cellular Immunology* (Vol. 310, pp. 14–26). Academic Press Inc. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.08.012

Banday, M. Z., Sameer, A. S., & Nissar, S. (2020). Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna Journal of Medicine*, *10*(04), 174–188. https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_53_20

Battelino, T., Danne, T., Bergenstal, R. M., Amiel, S. A., Beck, R., Biester, T., Bosi, E., Buckingham, B. A., Cefalu, W. T., Close, K. L., Cobelli, C., Dassau, E., Hans DeVries, J., Donaghue, K. C., Dovc, K., Doyle, F. J., Garg, S., Grunberger, G., Heller, S., … Phillip, M. (2019). Clinical targets for continuous glucose monitoring data interpretation: Recommendations from the international consensus on time in range. *Diabetes Care*, *42*(8), 1593–1603. https://doi.org/10.2337/dci19-0028

Bansal, V., Kalita, J., & Misra, U. K. (2006). Diabetic neuropathy. In *Postgraduate Medical Journal* (Vol. 82, Issue 964, pp. 95–100). https://doi.org/10.1136/pgmj.2005.036137

Berman, M. A., Sandborg, C. I., Wang, Z., Imfeld, K. L., Zaldivar, F., Dadufalza, V., & Buckingham, B. A. (1996). Decreased IL-4 production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Immunology*, *157*(10), 4690–4696. https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.10.4690

Beeton, C., Wulff, H., Standifer, N. E., Azam, P., Mullen, K. M., Pennington, M. W., Kolski-Andreaco, A., Wei, E., Grino, A., Counts, D. R., Wang, P. H., Leehealey, C. J., Andrews, B. S., Sankaranarayanan, A., Homerick, D., Roeck, W. W., Tehranzadeh, J., Stanhope, K. L., Zimin, P., … Chandy, K. G. (2006). *Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases*. https://www.pnas.org

Berman, M. A., Sandborg, C. I., Wang, Z., Imfeld, K. L., Zaldivar, F., Dadufalza, V., & Buckingham, B. A. (1996). Decreased IL-4 production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Immunology*, *157*(10), 4690–4696. https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.10.4690

Blevins, H. M., Xu, Y., Biby, S., & Zhang, S. (2022). The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.879021

Blunt, J. W. Copp, B. R. Keyzers, R. A. Munro, M. H. G. and Prinsep, M. R. (2016) "Marine natural products," Mar. 01, 2016, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/c5np00156k.

Bomprezzi, R., Ringnér, M., Kim, S., Bittner, M. L., Khan, J., Chen, Y., Elkahloun, A., Yu, A., Bielekova, B., Meltzer, P. S., Martin, R., McFarland, H. F., & Trent, J. M. (2003). Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: Identifying pathways relevant to disease. *Human Molecular Genetics*, *12*(17), 2191–2199. https://doi.org/10.1093/hmg/ddg221

Böni-Schnetzler, M., Boller, S., Debray, S., Bouzakri, K., Meier, D. T., Prazak, R., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Ehses, J. A., Schuit, F. C., & Donath, M. Y. (2009). Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I. *Endocrinology*, *150*(12), 5218–5229. https://doi.org/10.1210/en.2009-0543

Bonner, R., Albajrami, O., Hudspeth, J., & Upadhyay, A. (2020). Diabetic Kidney Disease. In *Primary Care - Clinics in Office Practice* (Vol. 47, Issue 4, pp. 645–659). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1016/j.pop.2020.08.004

Brownlee, M. (2001). *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. https://doi.org/10.1038/414813a

Bulek, A. M., Cole, D. K., Skowera, A., Dolton, G., Gras, S., Madura, F., Fuller, A.,Miles, J. J., Gostick, E., Price, D. A., Drijfhout, J. W., Knight, R. R., Huang, G. C., Lissin, N., Molloy, P. E., Wooldridge, L., Jakobsen, B. K., Rossjohn, J., Peakman, M., … Sewell, A. K. (2012). Structural basis for the killing of human beta cells by CD8 + T cells in type 1 diabetes. *Nature Immunology*, *13*(3), 283–289. https://doi.org/10.1038/ni.2206

Burch, T. C., Morris, M. A., Campbell-Thompson, M., Pugliese, A., Nadler, J. L., & Nyalwidhe, J. O. (2015). Proteomic analysis of disease stratified human pancreas tissue indicates unique signature of type 1 diabetes. *PLoS ONE*, *10*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135663

Burrack, A. L., Martinov, T., & Fife, B. T. (2017). T cell-mediated beta cell destruction: Autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 8, Issue DEC). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00343

Calderon, B., Suri, A., Pan, X. O., Mills, J. C., & Unanue, E. R. (2008). IFN-Dependent Regulatory Circuits in Immune Inflammation Highlighted in Diabetes 1. In *The Journal of Immunology* (Vol. 181). http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/181/10/6964/1263131/zim02208006964.pdf

Campbell, I. L., Wong, G. H. W., Schrader, J. W., & Harrison, L. C. (1985). *Interferon-Y Enhances the Expression of the Major Histocompatibility Class I Antigens on Mouse Pancreatic Beta Cells*. http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/34/11/1205/353603/34-11-1205.pdf

Campbell-Thompson, M. L., Atkinson, M. A., Butler, A. E., Chapman, N. M., Frisk, G., Gianani, R., Giepmans, B. N., Von Herrath, M. G., Hyöty, H., Kay, T. W., Korsgren, O., Morgan, N. G., Powers, A. C., Pugliese, A., Richardson, S. J., Rowe, P. A., Tracy, S., & In'T Veld, P. A. (2013). The diagnosis of insulitis in human type 1 diabetes. In *Diabetologia* (Vol. 56, Issue 11, pp. 2541–2543). https://doi.org/10.1007/s00125-013-3043-5

Cano-Cano, F., Gómez-Jaramillo, L., Ramos-García, P., Arroba, A. I., & Aguilar-Diosdado, M. (2022). IL-1β Implications in Type 1 Diabetes Mellitus Progression: Systematic Review and Meta-Analysis. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 11, Issue 5). MDPI. https://doi.org/10.3390/jcm11051303

Cano-Cano, F., Alcalde-Estévez, E., Gómez-Jaramillo, L., Iturregui, M., Sánchez-Fernández, E. M., García Fernández, J. M., Ortiz Mellet, C., Campos-Caro, A., López-Tinoco, C., Aguilar-Diosdado, M., Valverde, Á. M., & Arroba, A. I. (2021). Anti-Inflammatory (M2) Response Is Induced by a sp2-Iminosugar Glycolipid Sulfoxide in Diabetic Retinopathy. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.632132

Care, D and S. S. Suppl, "2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes-2021," *Diabetes Care*, vol. 44, no. January, pp. S15–S33, 2021, doi: 10.2337/dc21-S002.

Carmichael, J., Fadavi, H., & Tavakoli, M. (2022). Neurodegeneration of the cornea and retina in patients with type 1 diabetes without clinical evidence of diabetic retinopathy. *Frontiers in Endocrinology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.790255

Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue MAY). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847

Catalioto, R. M., Valenti, C., Maggi, C. A., & Giuliani, S. (2015). Enhanced Ca2+ response and stimulation of prostaglandin release by the bradykinin B2 receptor in human retinal pigment epithelial cells primed with proinflammatory cytokines. *Biochemical Pharmacology*, *97*(2), 189–202.

https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.034

Cattin-Roy, A. N., Laffey, K. G., Le, L. B., Schrum, A. G., & Zaghouani, H. (2024). Reduced thymic IL-4 impairs negative T cell selection in nonobese diabetic mice. *Journal of Clinical Investigation*, *134*(23). https://doi.org/10.1172/JCI163417

Chen, J., Zhong, H., Yu, H., Sun, J., Shen, B., Xu, X., Huang, P., Huang, S., & Zhong, Y. (2023). Interleukin-17A modulates retinal inflammation through regulating microglial activation via the p38 MAPK pathway in experimental glaucoma neuropathy Summary Background. https://ssrn.com/abstract=4137653

Chen, S., Meng, G., Wang, X., Jiang, H., Shen, M., Wang, X., & Wang, C. (2024). Analysis of frequency changes in CD8+ regulatory T cell subsets in peripheral blood of individuals with type 1 diabetes. *Diabetology and Metabolic Syndrome* , *16*(1). https://doi.org/10.1186/s13098-024-01549-9

Chen, S., Sun, Q., Sun, D., Willette-Brown, J., Anderson, M. J., Gu, Q., Lewandoski, M., Hu, Y., Zhu, F., Wei, F., & Zhang, J. (2020). C-CBL is required for inhibition of angiogenesis through modulating JAK2/STAT3 activity in ROP development. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *132*. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110856

Chimienti, F., Favier, A., & Seve, M. (2005). ZnT-8, a pancreatic beta-cell-specific zinc transporter. *BioMetals*, *18*(4), 313–317. https://doi.org/10.1007/s10534-005-3687-9

Christian, C. W., Loi, M., Ligeon, L. A., Gannagé, M., Lünemann, J. D., & Münz, C. (2018). Endocytosis regulation by autophagy proteins in MHC restricted antigen presentation. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 52, pp. 68–73). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.04.014

Christinaki, E., Kulenovic, H., Hadoux, X., Baldassini, N., Van Eijgen, J., De Groef, L., Stalmans, I., & van Wijngaarden, P. (2022). Retinal imaging biomarkers of neurodegenerative diseases. In *Clinical and Experimental Optometry* (Vol. 105, Issue 2, pp. 194–204). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/08164622.2021.1984179

Citro, A., Valle, A., Cantarelli, E., Mercalli, A., Pellegrini, S., Liberati, D., Daffonchio, L., Kastsiuchenka, O., Ruffini, P. A., Battaglia, M., Allegretti, M., & Piemonti, L. (2015). CXCR1/2 inhibition blocks and reverses type 1 diabetes in mice. *Diabetes*, *64*(4), 1329–1340. https://doi.org/10.2337/db14-0443

Cobo-Vuilleumier, N., Rodríguez-Fernandez, S., López-Noriega, L., Lorenzo, P., Franco, J., Lachaud, C., Martin Vazquez, E., Araujo Legido, R., Dorronsoro, A., López-Férnandez-Sobrino, R., Fernádez-Santos, B., Salas-Lloret, D., van Overbeek, N., Ramos-Rodriguez, M., Mateo-Rodríguez, C., Hidalgo, L., Nano, R., Arroba, A., Campos Caro, A., … Gauthier, B. (2023). *LRH-1/NR5A2 Activation Rewires Immunometabolism Blunting Inflammatory Immune Cell Progression in Individuals with Type 1 Diabetes and Enhances Human Islet Function in Mice*. https://doi.org/10.1101/2023.09.18.558230

Concannon, P., Rich, S. S., & Nepom, G. T. (2009). *Genetics of Type 1A Diabetes*. https://doi.org/10.1056/NEJMra0808284

Consuegra-Fernández, M., Lin, F., Fox, D. A., & Lozano, F. (2018). Clinical and experimental evidence for targeting CD6 in immune-based disorders. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 17, Issue 5, pp. 493–503). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.12.004

Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, *26*(12), 1367–1372. https://doi.org/10.1038/nbt.1511

Cunha, L. P., Figueiredo, E. A., Araújo, H. P., Costa-Cunha, L. V. F., Costa, C. F., Neto, J. de M. C., Matos, A. M. F., de Oliveira, M. M., Bastos, M. G., & Monteiro, M. L. R. (2018). Non-mydriatic fundus retinography in screening for diabetic retinopathy: Agreement between family physicians, general ophthalmologists, and a retinal specialist. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(MAY). https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00251

Damond, N., Engler, S., Zanotelli, V. R. T., Schapiro, D., Wasserfall, C. H., Kusmartseva, I., Nick, H. S., Thorel, F., Herrera, P. L., Atkinson, M. A., & Bodenmiller, B. (2019). A Map of Human Type 1 Diabetes Progression by Imaging Mass Cytometry. *Cell Metabolism*, *29*(3), 755-768.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.014

De Clerck, E. E. B., Schouten, J. S. A. G., Berendschot, T. T. J. M., Kessels, A. G. H., Nuijts, R. M. M. A., Beckers, H. J. M., Schram, M. T., Stehouwer, C. D. A., & Webers, C. A. B. (2015). New ophthalmologic imaging techniques for detection and monitoring of neurodegenerative changes in diabetes: A systematic review. In *The Lancet Diabetes and Endocrinology* (Vol. 3, Issue 8, pp. 653–663). Lancet Publishing Group. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00136-9

Dexiu, C., Xianying, L., Yingchun, H., & Jiafu, L. (2022). Advances in CD247. In *Scandinavian Journal of Immunology* (Vol. 96, Issue 1). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1111/sji.13170

Diagnosis and classification of diabetes mellitus. (2010). In *Diabetes Care* (Vol. 33, Issue SUPPL. 1). https://doi.org/10.2337/dc10-S062

Díaz-Paredes, E., Martín-Loro, F., Rodríguez-Marín, R., Gómez-Jaramillo, L., Sánchez-Fernández, E. M., Carrillo-Carrión, C., & Arroba, A. I. (2025). Exploring a Novel Anti-Inflammatory Therapy for Diabetic Retinopathy Based on Glyco-Zeolitic-Imidazolate Frameworks. Pharmaceutics, 17(6). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17060791

DiMeglio, L. A., Evans-Molina, C., & Oram, R. A. (2018). Type 1 diabetes. In *The Lancet* (Vol. 391, Issue 10138, pp. 2449–2462). Lancet Publishing Group. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31320-5

Donate-Correa, J., Luis-Rodríguez, D., Martín-Núñez, E., Tagua, V. G., Hernández-Carballo, C., Ferri, C., Rodríguez-Rodríguez, A. E., Mora-Fernández, C., & Navarro-González, J. F. (2020). Inflammatory targets in diabetic nephropathy. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 9, Issue 2). MDPI. https://doi.org/10.3390/jcm9020458

Donath, M. Y., & Shoelson, S. E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 11, Issue 2, pp. 98–107). https://doi.org/10.1038/nri2925

Duh, E. J., Sun, J. K., & Stitt, A. W. (2017). Diabetic retinopathy: Current understanding, mechanisms, and treatment strategies. In *JCI Insight* (Vol. 2, Issue 14). American Society for Clinical Investigation. https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.93751

Durinovic-Belló, I., Wu, R. P., Gersuk, V. H., Sanda, S., Shilling, H. G., & Nepom, G. T. (2010). Insulin gene VNTR genotype associates with frequency and phenotype of the autoimmune response to proinsulin. *Genes and Immunity*, *11*(2), 188–193. https://doi.org/10.1038/gene.2009.108

Dzau, V. J., & Ginsburg, G. S. (2016). Realizing the full potential of precision medicine in health and health care. In *JAMA - Journal of the American Medical Association* (Vol. 316, Issue 16, pp. 1659–1660). American Medical Association. https://doi.org/10.1001/jama.2016.14117

Elhodaky, M., & Diamond, A. M. (2018). Selenium-binding protein 1 in human health and disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 11). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms19113437

Eter, P., Elves, J. D., & Oitt, V. M. R. (2000). *T HE I MMUNE S YSTEM First of Two Parts* (Vol. 343).

Fekrvand, S., Khanmohammadi, S., Abolhassani, H., & Yazdani, R. (2022). B- and T-Cell Subset Abnormalities in Monogenic Common Variable Immunodeficiency. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.912826

Feldman, E. L., Callaghan, B. C., Pop-Busui, R., Zochodne, D. W., Wright, D. E., Bennett, D. L., Bril, V., Russell, J. W., & Viswanathan, V. (2019). Diabetic neuropathy. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 5, Issue 1). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1

Fouda, A. Y., Xu, Z., Shosha, E., Lemtalsi, T., Chen, J., Toque, H. A., Tritz, R., Cui, X., Stansfield, B. K., Huo, Y., Rodriguez, P. C., Smith, S. B., Caldwell, R. W., Narayanan, S. P., & Caldwell, R.B. (2018). Arginase 1 promotes retinal neurovascular protection from ischemia through suppression of macrophage inflammatory responses. *Cell Death and Disease*, *9*(10). https://doi.org/10.1038/s41419-018-1051-6

Frank, S. R., & Hansen, S. H. (2008). The PIX-GIT complex: A G protein signaling cassette in control of cell shape. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 19, Issue 3, pp. 234–244). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.01.002

Fragiotta, S., Abdolrahimzadeh, S., Dolz-Marco, R., Sakurada, Y., Gal-Or, O., & Scuderi, G. (2021). Significance of Hyperreflective Foci as an Optical Coherence Tomography Biomarker in Retinal Diseases: Characterization and Clinical Implications. In *Journal of Ophthalmology* (Vol. 2021). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2021/6096017

Fuchs, Y. F., Eugster, A., Dietz, S., Sebelefsky, C., Kühn, D., Wilhelm, C., Lindner, A., Gavrisan, A., Knoop, J., Dahl, A., Ziegler, A. G., & Bonifacio, E. (2017). CD8+ T cells specific for the islet autoantigen IGRP are restricted in their T cell receptor chain usage. *Scientific Reports*, *7*. https://doi.org/10.1038/srep44661

Gao, S., Wake, H., Gao, Y., Wang, D., Mori, S., Liu, K., Teshigawara, K., Takahashi, H., & Nishibori, M. (2019). Histidine-rich glycoprotein ameliorates endothelial barrier dysfunction through regulation of NF-κB and MAPK signal pathway. *British Journal of Pharmacology*, *176*(15), 2808–2824. https://doi.org/10.1111/bph.14711

Genuth, S. M., Palmer, J. P., & Nathan, D. M. (2021). *Chapter 1: Classification and Diagnosis of Diabetes*.

Ghosh, P., Sahoo, R., Vaidya, A., Chorev, M., & Halperin, J. A. (2015). Role of complement and complement regulatory proteins in the complications of diabetes. In *Endocrine Reviews* (Vol. 36, Issue 3, pp. 272–288). Endocrine Society. https://doi.org/10.1210/er.2014-1099

Gnudi, L., Coward, R. J. M., & Long, D. A. (2016). Diabetic Nephropathy: Perspective on Novel Molecular Mechanisms. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 27, Issue 11, pp. 820–830). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.07.002

Gnudi, L., & Long, D. A. (2020). *Diabetic Nephropathy Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 2067*. http://www.springer.com/series/7651

Grigsby, J. G., Cardona, S. M., Pouw, C. E., Muniz, A., Mendiola, A. S., Tsin, A. T. C., Allen, D. M., & Cardona, A. E. (2014). The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy. In *Journal of Ophthalmology* (Vol. 2014). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2014/705783

Guo, M., Guo, H., Zhu, J., Wang, F., Chen, J., Wan, C., Deng, Y., Wang, F., Xu, L., Chen, Y., Li, R., Liu, S., Zhang, L., Wang, Y., Zhou, J., & Li, S. (2024). A novel subpopulation of monocytes with a strong interferon signature indicated by SIGLEC-1 is present in patients with in recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia*, *67*(4), 623–640. https://doi.org/10.1007/s00125-024-06098-4

Guo, Y., Zheng, X., & Zheng, S. (2024). Retinal Microvasculopathy with different insulin infusion therapies in children with Type 1 diabetes mellitus without clinical diabetic retinopathy. *Retina*, 44(5), 895-900. Doi: 10.1097/IAE.0000000000004028.

Gur, C., Porgador, A., Elboim, M., Gazit, R., Mizrahi, S., Stern-Ginossar, N., Achdout, H., Ghadially, H., Dor, Y., Nir, T., Doviner, V., Hershkovitz, O., Mendelson, M., Naparstek, Y., & Mandelboim, O. (2010). The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nature Immunology*, *11*(2), 121–128. https://doi.org/10.1038/ni.1834

Ha, H., Debnath, B., & Neamati, N. (2017). Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases. In *Theranostics* (Vol. 7, Issue 6, pp. 1543–1588). Ivyspring International Publisher. https://doi.org/10.7150/thno.15625

Hang, H., Yuan, S., Yang, Q., Yuan, D., & Liu, Q. (2014). Multiplex bead array of plasma cytokines in type 2 diabetes mellitus with diabetic retinopathy. *Molecular Vision*, *20*, 1137–1145.

Hato, T., & Dagher, P. C. (2015). How the innate immune system senses trouble and causes trouble. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *10*(8), 1459–1469. https://doi.org/10.2215/CJN.04680514

Herold, K. C., Delong, T., Perdigoto, A. L., Biru, N., Brusko, T. M., & Walker, L. S. K. (2024). The immunology of type 1 diabetes. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 24, Issue 6, pp. 435–451). Nature Research. https://doi.org/10.1038/s41577-023-00985-4

Hoeks, C., Puijfelik, F. van, Koetzier, S. C., Rip, J., Corsten, C. E. A., Wierenga-Wolf, A. F., Melief, M. J., Stinissen, P., Smolders, J., Hellings, N., Broux, B., & van Luijn, M. M. (2024). Differential Runx3, Eomes, and T-bet expression subdivides MS-associated CD4+ T cells with brain-homing capacity. *European Journal of Immunology*, *54*(2). https://doi.org/10.1002/eji.202350544

Hogquist, K. A., Xing, Y., Hsu, F.-C., & Shapiro, V. S. (2015). T Cell Adolescence: Maturation Events Beyond Positive Selection. *The Journal of Immunology*, *195*(4), 1351–1357. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501050

Hölscher, M. E., Bode, C., & Bugger, H. (2016). Diabetic cardiomyopathy: Does the type of diabetes matter? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 12). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms17122136

Howson, J. M. M., Stevens, H., Smyth, D. J., Walker, N. M., Chandler, K. A., Bingley, P. J., & Todd, J. A. (2011). Evidence that HLA class I and II associations with type 1 diabetes, autoantibodies to GAD and autoantibodies to IA-2, are distinct. *Diabetes*, *60*(10), 2635–2644. https://doi.org/10.2337/db11-0131

Hsu, C. C., Kanter, J. E., Kothari, V., & Bornfeldt, K. E. (2023). Quartet of APOCs and the Different Roles They Play in Diabetes. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* (Vol. 43, Issue 7, pp. 1124–1133). Lippincott Williams and Wilkins. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318290

Huang, H., Jansonius, N. M., Chen, H., & Los, L. I. (2022). Hyperreflective Dots on OCT as a Predictor of Treatment Outcome in Diabetic Macular Edema: A Systematic Review. In *Ophthalmology Retina* (Vol. 6, Issue 9, pp. 814–827). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.oret.2022.03.020

Huffaker, M. F., Sanda, S., Chandran, S., Chung, S. A., St. Clair, E. W., Nepom, G. T., & Smilek, D. E. (2021). Approaches to Establishing Tolerance in Immune Mediated Diseases. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744804

Hull, C. M., Peakman, M., & Tree, T. I. M. (2017). Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? In *Diabetologia* (Vol. 60, Issue 10, pp. 1839–1850). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/s00125-017-4377-1

Hundhausen, C., Roth, A., Whalen, E., Chen, J., Schneider, A., Long, S. A., Wei, S., Rawlings, R., Kinsman, M., Evanko, S. P., Wight, T. N., Greenbaum, C. J., Cerosaletti, K., & Buckner, J. H. (2016). *Enhanced T cell responses to IL-6 in type 1 diabetes are associated with early clinical disease and increased IL-6 receptor expression*. www.extend-study.org/

Husseini, M., Wang, G. S., Patrick, C., Crookshank, J. A., MacFarlane, A. J., Ariana Noel, J., Strom, A., & Scott, F. W. (2015). Heme oxygenase-1 induction prevents autoimmune diabetes in association with pancreatic recruitment of m2-like macrophages, mesenchymal cells, and fibrocytes. *Endocrinology (United States)*, *156*(11), 3937–3949. https://doi.org/10.1210/en.2015-1304

Ilonen, J., Lempainen, J., & Veijola, R. (2019). The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 15, Issue 11, pp. 635–650). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0254-y

Insel, R. A., Dunne, J. L., Atkinson, M. A., Chiang, J. L., Dabelea, D., Gottlieb, P. A., Greenbaum, C. J., Herold, K. C., Krischer, J. P., Lernmark, A., Ratner, R. E., Rewers, M. J., Schatz, D. A., Skyler, J. S., Sosenko, J. M., & Ziegler, A. G. (2015). Staging presymptomatic type 1 diabetes: A scientific statement of jdrf, the endocrine society, and the American diabetes association. *Diabetes Care*, *38*(10), 1964–1974. https://doi.org/10.2337/dc15-1419

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. In *Nature Immunology* (Vol. 16, Issue 4, pp. 343–353). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/ni.3123

Jackson-Thompson, B. M., Torrero, M., Mitre, B. K., Long, J., Packiam, M., & Mitre, E. (2020). Axenic Caenorhabditis elegans antigen protects against development of type-1 diabetes in NOD mice. *Journal of Translational Autoimmunity*, *3*. https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2020.100065

Jaeckel, E., Von Boehmer, H., & Manns, M. P. (2005). Rapid Publication Antigen-Specific FoxP3-Transduced T-Cells Can Control Established Type 1 Diabetes. http://diabetes.diabetesjournals.org

Jenkins, A. J., Joglekar, M. V., Hardikar, A. A., Keech, A. C., O'Neal, D. N., & Januszewski, A. S. (2015). Biomarkers in diabetic retinopathy. In *Review of Diabetic Studies* (Vol. 12, Issues 1–2, pp. 159–195). Society for Biomedical Diabetes Research. https://doi.org/10.1900/RDS.2015.12.159

Jia, G., Hill, M. A., & Sowers, J. R. (2018). Diabetic cardiomyopathy: An update of mechanisms contributing to this clinical entity. In *Circulation Research* (Vol. 122, Issue 4, pp. 624–638). Lippincott Williams and Wilkins. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311586

Jin, Z., Zhang, Q., Liu, K., Wang, S., Yan, Y., Zhang, B., & Zhao, L. (2024). The association between interleukin family and diabetes mellitus and its complications: An overview of systematic reviews and meta-analyses. In *Diabetes Research and Clinical Practice* (Vol. 210). Elsevier Ireland Ltd. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2024.111615

Johar, D., Ahmed, S. M., El. Hayek, S., Al-Dewik, N., Bahbah, E. I., Omar, N. H., Mustafa, M., Salman, D. O., Fahmey, A., Mottawea, M., Azouz, R. A. M., & Bernstein, L. (2019). Diabetes-induced Proteome Changes Throughout Development. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, *19*(6), 732–743. https://doi.org/10.2174/1871530319666190305153810

Jolivalt, C. G., Hurford, R., Lee, C. A., Dumaop, W., Rockenstein, E., & Masliah, E. (2010). Type 1 diabetes exaggerates features of Alzheimer's disease in APP transgenic mice. *Experimental Neurology*, *223*(2), 422–431. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.11.005

Jones, A. L., Hulett, M. D., & Parish, C. R. (2005). Histidine-rich glycoprotein: A novel adaptor protein in plasma that modulates the immune, vascular and coagulation systems. In *Immunology and Cell Biology* (Vol. 83, Issue 2, pp. 106–118). https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01320.x

Jun, H. S., Khil, L. Y., & Yoon, J. W. (2002). Review Role of glutamic acid decarboxylase in the pathogenesis of type 1 diabetes. In *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* (Vol. 59).

Kaech, S. M., & Wherry, E. J. (2007). Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation during Viral Infection. In *Immunity* (Vol. 27, Issue 3, pp. 393–405). https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.007

Kahaly, G. J., & Hansen, M. P. (2016). Type 1 diabetes associated autoimmunity. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 15, Issue 7, pp. 644–648). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.autrev.2016.02.017

Karmakar, R., Pahari, P., & Mal, D. (2014). Phthalides and phthalans: Synthetic methodologies and their applications in the total synthesis. In Chemical Reviews (Vol. 114, Issue 12, pp. 6213–6284). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/cr400524q

Katsarou, A., Gudbjörnsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, A. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16

Kawakami, Y., Raya, Á., Raya, R. M., Rodriguez-Esteban, C., & Izplsúa Belmonte, J. C. (2005). Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature*, *435*(7039), 165–171. https://doi.org/10.1038/nature03512

Khan, N. U., Lin, J., Liu, X., Li, H., Lu, W., Zhong, Z., Zhang, H., Waqas, M., & Shen, L. (2020). Insights into predicting diabetic nephropathy using urinary biomarkers. In *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* (Vol. 1868, Issue 10). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140475

Khanolkar, M. P., Bain, S. C., & Stephens, J. W. (2008). The diabetic foot. In *QJM: An International Journal of Medicine* (Vol. 101, Issue 9, pp. 685–695). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/qjmed/hcn027

Kinuthia, U. M., Wolf, A., & Langmann, T. (2020). Microglia and Inflammatory Responses in Diabetic Retinopathy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.564077

Klimontov, V. V., Mavlianova, K. R., Orlov, N. B., Semenova, J. F., & Korbut, A. I. (2023). Serum Cytokines and Growth Factors in Subjects with Type 1 Diabetes: Associations with Time in Ranges and Glucose Variability. *Biomedicines*, *11*(10). https://doi.org/10.3390/biomedicines11102843

Kokona, D., Ebneter, A., Escher, P., & Zinkernagel, M. S. (2018). Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents disruption of the blood-retina barrier during chronic inflammation. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s12974-018- 1373-4

Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. In *Immunity* (Vol. 48, Issue 2, pp. 202–213). Cell Press. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007

Kumara Venkatesan, S., & Review, M. (2021). Classification of Diabetes Mellitus: A Review Venkatesan SK. Classification of Diabetes Mellitus: A Review. In *Int J Diabetes Manag* (Vol. 1, Issue 1).

Lackey, D. E., & Olefsky, J. M. (2016). Regulation of metabolism by the innate immune system. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 12, Issue 1, pp. 15–20). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.189

Lampasona, V., & Liberati, D. (2016). Islet Autoantibodies. In *Current Diabetes Reports* (Vol. 16, Issue 6). Current Medicine Group LLC 1. https://doi.org/10.1007/s11892-016-0738-2

Langmann, T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *Journal of Leukocyte Biology*, *81*(6), 1345–1351. https://doi.org/10.1189/jlb.0207114

Lapenna, A., De Palma, M., & Lewis, C. E. (2018). Perivascular macrophages in health and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 18, Issue 11, pp. 689–702). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0056-9

Lauritano, C. and Ianora, A. (2016) “Marine organisms with anti-diabetes properties,” Dec. 01, 2016, *MDPI AG*. doi: 10.3390/md14120220.

Lechner, J., O’Leary, O. E., & Stitt, A. W. (2017). The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Research*, *139*, 7–14. https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.04.003

Léger, H., Santana, E., Leu, N. A., Smith, E. T., Beltran, W. A., Aguirre, G. D., & Luca, F. C. (2018). Ndr kinases regulate retinal interneuron proliferation and homeostasis. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-30492-9

Lieberman, S. M., Evans, A. M., Han, B., Takaki, T., Vinnitskaya, Y., Caldwell, J. A., Serreze, D. V, Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Nathenson, S. G., Santamaria, P., & DiLorenzo, T. P. (2003). *Identification of the cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8 T cells in autoimmune diabetes*. www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0932778100

Lombardi, A., & Tomer, Y. (2017). Interferon alpha impairs insulin production in human beta cells via endoplasmic reticulum stress. *Journal of Autoimmunity*, *80*, 48–55. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.02.002

London, A., Itskovich, E., Benhar, I., Kalchenko, V., Mack, M., Jung, S., & Schwartz, M. (2011). Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-derived macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, *208*(1), 23–39. https://doi.org/10.1084/jem.20101202

Long, S. A., Cerosaletti, K., Bollyky, P. L., Tatum, M., Shilling, H., Zhang, S., Zhang, Z. Y., Pihoker, C., Sanda, S., Greenbaum, C., & Buckner, J. H. (2010). Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4+CD25+ regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes*, *59*(2), 407–415. https://doi.org/10.2337/db09-0694

Long, S. A., & Linsley, P. S. (2024). Integrating Omics into Functional Biomarkers of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *14*(7). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041602

Lorena, L., Maristella, P., Federica, M., Giuseppe, F., Luigi, A., & Eleonora, C. (2023). Omics approaches to understanding the efficacy and safety of disease-modifying treatments in multiple sclerosis. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1076421

Lorenzo-Almorós, A., Cepeda-Rodrigo, J. M., & Lorenzo. (2022). Diabetic cardiomyopathy. In *Revista Clinica Espanola* (Vol. 222, Issue 2, pp. 100–111). Sociedad Espanola de Medicina Interna (SEMI). https://doi.org/10.1016/j.rce.2019.10.013

Lu, J., Liu, J., Li, L., Lan, Y., & Liang, Y. (2020). Cytokines in type 1 diabetes: mechanisms of action and immunotherapeutic targets. In *Clinical and Translational Immunology* (Vol. 9, Issue 3). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/cti2.1122

Luo, S., Zhang, L., Wei, C., Guo, C., Meng, Z., Zeng, H., Hou, L., Wang, L., Liu, Z., Du, Y., Tan, S., Zhang, Y., Xu, X., Liang, L., & Zhou, Y. (2025). TCL1A in naïve B cells as a therapeutic target for type 1 diabetes. *EBioMedicine*, *113*. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2025.105593

Lv, J., Gao, R., Wang, Y., Huang, C., & Wu, R. (2022). Protective effect of leukemia inhibitory factor on the retinal injury induced by acute ocular hypertension in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *25*(1). https://doi.org/10.3892/etm.2022.11717

Ma, Y., Ji, J., Liu, X., Zheng, X., Xu, L., Zhou, Q., Li, Z., & Yang, L. (2024). Integrative Analysis by Mendelian Randomization and Large-Scale Single-Cell Transcriptomics Reveals Causal Links between B Cell Subtypes and Diabetic Kidney Disease. *Kidney Diseases*, 1–19. https://doi.org/10.1159/000539689

Mannering, S. I., Harrison, L. C., Williamson, N. A., Morris, J. S., Thearle, D. J., Jensen, K. P., Kay, T. W. H., Rossjohn, J., Falk, B. A., Nepom, G. T., & Purcell, A. W. (2005). The insulin A-chain epitope recognized by human T cells is posttranslationally modified. *Journal of Experimental Medicine*, *202*(9), 1191–1197. https://doi.org/10.1084/jem.20051251

Mariño, E., Tan, B., Binge, L., Mackay, C. R., & Grey, S. T. (2012). B-cell cross-presentation of autologous antigen precipitates diabetes. *Diabetes*, *61*(11), 2893–2905. https://doi.org/10.2337/db12-0006

Marroqui, L., Dos Santos, R. S., Op de beeck, A., Coomans de Brachène, A., Marselli, L., Marchetti, P., & Eizirik, D. L. (2017). Interferon-α mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. *Diabetologia*, *60*(4), 656–667. https://doi.org/10.1007/s00125-016-4201-3

Martín-Loro, F., Cano-Cano, F., Ortega, M. J., Cuevas, B., Gómez-Jaramillo, L., González-Montelongo, M. del C., Freisenhausen, J. C., Lara-Barea, A., Campos-Caro, A., Zubía, E., Aguilar-Diosdado, M., & Arroba, A. I. (2024). Arylphthalide Delays Diabetic Retinopathy via Immunomodulating the Early Inflammatory Response in an Animal Model of Type 1 Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(15). https://doi.org/10.3390/ijms25158440

Mason, R. H., Minaker, S. A., Lahaie Luna, G., Bapat, P., Farahvash, A., Garg, A., Bhambra, N., & Muni, R. H. (2022). Changes in aqueous and vitreous inflammatory cytokine levels in proliferative diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis. In *Eye (Basingstoke)*. Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s41433-022-02127-x

Matejuk, A., Vandenbark, A. A., & Offner, H. (2021). Cross-Talk of the CNS With Immune Cells and Functions in Health and Disease. In *Frontiers in Neurology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fneur.2021.672455

Mathieu, C., Lahesmaa, R., Bonifacio, E., Achenbach, P., & Tree, T. (2018). Immunological biomarkers for the development and progression of type 1 diabetes. In *Diabetologia* (Vol. 61, Issue 11, pp. 2252–2258). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/s00125-018-4726-8

Mayer, A. M. S. Rodríguez, A. D. Taglialatela-Scafati, O. and Fusetani, N. (2017) "Marine pharmacology in 2012–2013: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action," 2017, *MDPI AG*. doi: 10.3390/md15090273.

Medhasi, S., & Chantratita, N. (2022). Human Leukocyte Antigen (HLA) System: Genetics and Association with Bacterial and Viral Infections. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2022). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2022/9710376

Melendez-Ramirez, L. Y., Richards, R. J., & Cefalu, W. T. (2010). Complications of type 1 diabetes. In *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* (Vol. 39, Issue 3, pp. 625–640). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.05.009

Metz, T. O., Qian, W. J., Jacobs, J. M., Gritsenko, M. A., Moore, R. J., Polpitiya, A. D., Monroe, M. E., Camp, D. G., Mueller, P. W., & Smith, R. D. (2008). Application of proteomics in the discovery of candidate protein biomarkers in a diabetes autoantibody standardization program sample subset. *Journal of Proteome Research*, *7*(2), 698–707. https://doi.org/10.1021/pr700606w

Midena, E., Pilotto, E., & Bini, S. (2018). Hyperreflective intraretinal Foci as an OCT biomarker of retinal inflammation in diabetic macular Edema. In *Investigative Ophthalmology and Visual Science* (Vol. 59, Issue 13, p. 5366). Association for Research in Vision and Ophthalmology Inc. https://doi.org/10.1167/iovs.18-25611

Miki, T., Yuda, S., Kouzu, H., & Miura, T. (2013). Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiology and clinical features. *Heart Failure Reviews*, *18*(2), 149–166. https://doi.org/10.1007/s10741-012-9313-3

Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 22, Issue 2, pp. 240–273). https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08

Mokhtar, D. M., Zaccone, G., Alesci, A., Kuciel, M., Hussein, M. T., & Sayed, R. K. A. (2023). Main Components of Fish Immunity: An Overview of the Fish Immune System. In *Fishes* (Vol. 8, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/fishes8020093

Morel, P. A. (2013). Dendritic cell subsets in type 1 diabetes: Friend or foe? In *Frontiers in Immunology* (Vol. 4, Issue DEC). https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00415

Nahorski, M. S., Borner, G. H. H., Shaikh, S. S., Davies, A. K., Al-Gazali, L., Antrobus, R., & Woods, C. G. (2018). Clathrin heavy chain 22 contributes to the control of neuropeptide degradation and secretion during neuronal development. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-19980-0

Nakayasu, E. S., Bramer, L. M., Ansong, C., Schepmoes, A. A., Fillmore, T. L., Gritsenko, M. A., Clauss, T. R., Gao, Y., Piehowski, P. D., Stanfill, B. A., Engel, D. W., Orton, D. J., Moore, R. J., Qian, W. J., Sechi, S., Frohnert, B. I., Toppari, J., Ziegler, A. G., Lernmark, Å., … Metz, T. O. (2023). Plasma protein biomarkers predict the development of persistent autoantibodies and type 1 diabetes 6 months prior to the onset of autoimmunity. *Cell Reports Medicine*, *4*(7). https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101093

Nascimento, O. J. M. do, Pupe, C. C. B., & Cavalcanti, E. B. U. (2016). Diabetic neuropathy. *Revista Dor*, *17*. https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160047

Nepom, G. T. (2022). Synergistic targeting of immunologic pathways to empower durable tolerance therapies. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.962177

Netea, M. G., Balkwill, F., Chonchol, M., Cominelli, F., Donath, M. Y., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Golenbock, D., Gresnigt, M. S., Heneka, M. T., Hoffman, H. M., Hotchkiss, R., Joosten, L. A. B., Kastner, D. L., Korte, M., Latz, E., Libby, P., Mandrup-Poulsen, T., Mantovani, A., Mills, K. H. G., … Dinarello, C. A. (2017). A guiding map for inflammation. In *Nature Immunology* (Vol. 18, Issue 8, pp. 826–831). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/ni.3790

Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2014) "Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development," 2014, *MDPI AG*. doi: 10.3390/md12010255.

Newman, D.J and Cragg, G. M. (2016) "Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014," Mar. 25, 2016, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.

Noble, J. A., & Erlich, H. A. (2012). Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(1). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007732

Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., & Corcoran, L. M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature Reviews Immunology*, *15*(3), 160–171. https://doi.org/10.1038/nri3795

Okada, Y., Ishimaru, A., Suzuki, R., & Okuyama, T. (2004). A new phloroglucinol derivative from the brown alga Eisenia bicyclis: potential for the effective treatment of diabetic complications. *Journal of Natural Products*, *67*(1), 103-105.

Olefsky, J. M., & Glass, C. K. (2009). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 72, pp. 219–246). https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135846

Oliver, K. M., Garvey, J. F., Ng, C. T., Veale, D. J., Fearon, U., Cummins, E. P., & Taylor, C. T. (2009). Hypoxia activates NF-κB-dependent gene expression through the canonical signaling pathway. *Antioxidants and Redox Signaling*, *11*(9), 2057–2064. https://doi.org/10.1089/ars.2008.2400

Ortega, M. J., Parra-Torrejón, B., Cano-Cano, F., Gómez-Jaramillo, L., González-Montelongo, M. C., & Zubía, E. (2022). Synthesis and Antioxidant/Anti-Inflammatory Activity of 3-Arylphthalides. *Pharmaceuticals*, *15*(5). https://doi.org/10.3390/ph15050588

Osum, K. C., Burrack, A. L., Martinov, T., Sahli, N. L., Mitchell, J. S., Tucker, C. G., Pauken, K. E., Papas, K., Appakalai, B., Spanier, J. A., & Fife, B. T. (2018). Interferon-gamma drives programmed death-ligand 1 expression on islet β cells to limit T cell function during autoimmune diabetes. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-26471-9

Pant, T., Lin, C.-W., Bedrat, A., Jia, S., Roethle, M. F., Truchan, N. A., Ciecko, A. E., Chen, Y.-G., & Hessner, M. J. (2024). Monocytes in type 1 diabetes families exhibit high cytolytic activity and subset abundances that correlate with clinical progression. In *Sci. Adv* (Vol. 10). https://www.science.org

Paschou, S. A., Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P., & Kanaka-Gantenbein, C. (2018). On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. In *Endocrine Connections* (Vol. 7, Issue 1, pp. R38–R46). BioScientifica Ltd. https://doi.org/10.1530/EC-17-0347

Pihoker, C., Gilliam, L. K., Hampe, C. S., & Lernmark, Å. (2005). *Autoantibodies in Diabetes*. http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/54/suppl_2/S52/380506/zdb11205000s52.pdf

Pociot, F., & McDermott, M. F. (2002). Genetics of type 1 diabetes mellitus. In *Genes and Immunity* (Vol. 3, Issue 5, pp. 235–249). https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363875

Pugilese, A., Zeller, M., Fernandez, A., Zalcberg, L., Bartlett, R., Ricordi, C., Pietropaolo, M., Eisenbarth, GS., Bennettt, S., & Dhavalkumar, P. (1997). The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variations at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *NatureGenetics*, *15*, 293–297. https://doi.org/10.1038/ng0397-293

Quevedo-Martínez, J. U., Garfias, Y., Jimenez, J., Garcia, O., Venegas, D., & Bautista De Lucio, V. M. (2021). Pro-inflammatory cytokine profile is present in the serum of Mexican patients with different stages of diabetic retinopathy secondary to type 2 diabetes. *BMJ Open Ophthalmology*, *6*(1). https://doi.org/10.1136/bmjophth-2021-000717

Rendra, E., Riabov, V., Mossel, D. M., Sevastyanova, T., Harmsen, M. C., & Kzhyshkowska, J. (2019). Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. In *Immunobiology* (Vol. 224, Issue 2, pp. 242– 253). Elsevier GmbH. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2018.11.010

Reynolds, L., Luo, Z., & Singh, K. (2023). Diabetic complications and prospective immunotherapy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1219598

Rodríguez-Pinto, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. In *Cellular Immunology* (Vol. 238, Issue 2, pp. 67–75). https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.02.005

Rojas, J., Bermudez, V., Palmar, J., Martínez, M. S., Olivar, L. C., Nava, M., Tomey, D., Rojas, M., Salazar, J., Garicano, C., & Velasco, M. (2018). Pancreatic beta cell death: Novel potential mechanisms in diabetes therapy. In *Journal of Diabetes Research* (Vol. 2018). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2018/9601801

Rolny, C., Mazzone, M., Tugues, S., Laoui, D., Johansson, I., Coulon, C., Squadrito, M. L., Segura, I., Li, X., Knevels, E., Costa, S., Vinckier, S., Dresselaer, T., Åkerud, P., De Mol, M., Salomäki, H., Phillipson, M., Wyns, S., Larsson, E., … Carmeliet, P. (2011). HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell*, *19*(1), 31–44. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.009

Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J. J., Turner, S. J., Godfrey, D. I., & McCluskey, J. (2015). T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annual Review of Immunology*, *33*, 169–200. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112334

Rübsam, A., Parikh, S., & Fort, P. E. (2018). Role of inflammation in diabetic retinopathy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 4). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms19040942

Rudraraju, M., Narayanan, S. P., & Somanath, P. R. (2020). Regulation of blood-retinal barrier cell-junctions in diabetic retinopathy. In *Pharmacological Research* (Vol. 161). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105115

Ryba-Stanisławowska, M., Rybarczyk-Kapturska, K., Myśliwiec, M., & Myśliwska, J. (2014). Elevated Levels of Serum IL-12 and IL-18 are Associated with Lower Frequencies of CD4+CD25highFOXP3+ Regulatory T cells in Young Patients with Type 1 Diabetes. *Inflammation*, *37*(5), 1513–1520. https://doi.org/10.1007/s10753-014-9878-1

Sakaguchi, S., Mikami, N., Wing, J. B., Tanaka, A., Ichiyama, K., & Ohkura, N. (2020). *Downloaded from www.annualreviews.org. Guest (guest)*. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042718

Samsu, N. (2021). Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. In *BioMed Research International* (Vol. 2021). Hindawi Limited. https://doi.org/10.1155/2021/1497449

Santos, P. F., Fazendeiro, B., Luca, F. C., Ambrósio, A. F., & Léger, H. (2023). The NDR/LATS protein kinases in neurobiology: Key regulators of cell proliferation, differentiation and migration in the ocular and central nervous system. *European Journal of Cell Biology*, *102*(2). https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151333

Saravia, J., Chapman, N. M., & Chi, H. (2019). Helper T cell differentiation. In *Cellular and Molecular Immunology* (Vol. 16, Issue 7, pp. 634–643). Chinese Soc Immunology. https://doi.org/10.1038/s41423-019-0220-6

Sarkar, S., Elliott, E. C., Henry, H. R., Ludovico, I. D., Melchior, J. T., Frazer-Abel, A., Webb-Robertson, B. J., Davidson, W. S., Holers, V. M., Rewers, M. J., Metz, T. O., & Nakayasu, E. S. (2023). Systematic review of type 1 diabetes biomarkers reveals regulation in circulating proteins related to complement, lipid metabolism, and immune response. In *Clinical Proteomics* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12014-023-09429-6

Sarvetnick, N., Liggitt, D., Pitts, S. L., Hansen, S. E., & Stewart', T. A. (1988). Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Induced in Transgenic Mice by Ectopic Expression of Class II MHC and Interferon-Gamma. In *Cell* (Vol. 52).

Saunders, K. A., Raine, T., Cooke, A., & Lawrence, C. E. (2007). Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infection and Immunity*, *75*(1), 397–407. https://doi.org/10.1128/IAI.00664-06

Scherm, M. G., Wyatt, R. C., Serr, I., Anz, D., Richardson, S. J., & Daniel, C. (2022). Beta cell and immune cell interactions in autoimmune type 1 diabetes: How they meet and talk to each other. In *Molecular Metabolism* (Vol. 64). Elsevier GmbH. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101565

Schneider, A., Rieck, M., Sanda, S., Pihoker, C., Greenbaum, C., & Buckner, J. H. (2008). The Effector T Cells of Diabetic Subjects Are Resistant to Regulation via CD4 FOXP3 Regulatory T Cells 1. In *The Journal of Immunology*. http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/181/10/7350/1263345/zim02208007350.pdf

Schroder, W. A., Major, L., & Suhrbier, A. (2011). The Role of SerpinB2 in Immunity. In *Critical ReviewsTM in Immunology* (Vol. 31, Issue 1).

Scuderi, S., D'amico, A. G., Federico, C., Saccone, S., Magro, G., Bucolo, C., Drago, F., & D'Agata, V. (2015). Different Retinal Expression Patterns of IL-1α, IL-1β, and Their Receptors in a Rat Model of Type 1 STZ-Induced Diabetes. *Journal of Molecular Neuroscience*, *56*(2), 431–439. https://doi.org/10.1007/s12031-015-0505-x

Sebastian, M. J., Khan, S. K., Pappachan, J. M., & Jeeyavudeen, M. S. (2023). Diabetes and cognitive function: An evidence-based current perspective. *World Journal of Diabetes*, *14*(2), 92–109. https://doi.org/10.4239/wjd.v14.i2.92

Sebina, I., & Pepper, M. (2018). Humoral immune responses to infection: common mechanisms and unique strategies to combat pathogen immune evasion tactics. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 51, pp. 46–54). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.02.001

Semeran, K., Pawłowski, P., Lisowski, Ł., Szczepaniak, I., Wójtowicz, J., Ławicki, S., Bakunowicz-ŁAzarczyk, A., & Bossowski, A. (2013). Plasma levels of il-17, VEGF, and adrenomedullin and s-cone dysfunction of the retina in children and adolescents without signs of retinopathy and with varied duration of diabetes. *Mediators of Inflammation*, *2013*. https://doi.org/10.1155/2013/274726

Sezginer, O., & Unver, N. (2024). Dissection of pro-tumoral macrophage subtypes and immunosuppressive cells participating in M2 polarization. In *Inflammation Research* (Vol. 73, Issue 9, pp. 1411–1423). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/s00011-024-01907-3

Shi, Q., Wang, Q., Wang, Z., Lu, J., & Wang, R. (2023). Systemic inflammatory regulators and proliferative diabetic retinopathy: A bidirectional Mendelian randomization study. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1088778

Shin, J., Nile, A., & Oh, J. W. (2021). Role of adaptin protein complexes in intracellular trafficking and their impact on diseases. In *Bioengineered* (Vol. 12, Issue 1, pp.8259–8278). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1982846

Shunmoogam, N., Naidoo, P., & Chilton, R. (2018). Paraoxonase (PON)-1: A brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance. In *Vascular Health and Risk Management* (Vol. 14, pp. 137–143). Dove Medical Press Ltd. https://doi.org/10.2147/VHRM.S165173

Si, S., Liu, H., Xu, L., & Zhan, S. (2024). Identification of novel therapeutic targets for chronic kidney disease and kidney function by integrating multi-omics proteome with transcriptome. *Genome Medicine*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s13073-024-01356-x

Simó, R., & Hernández, C. (2014). Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. In *Trends in Endocrinology and Metabolism* (Vol. 25, Issue 1, pp. 23–33). https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.09.005

Skowera, A., Ladell, K., McLaren, J. E., Dolton, G., Matthews, K. K., Gostick, E., Kronenberg-Versteeg, D., Eichmann, M., Knight, R. R., Heck, S., Powrie, J., Bingley, P. J., Dayan, C. M., Miles, J. J., Sewell, A. K., Price, D. A., & Peakman, M. (2015). β-Cell-specific CD8 T cell phenotype in type 1 diabetes reflects chronic autoantigen exposure. *Diabetes*, *64*(3), 916–925. https://doi.org/10.2337/db14-0332

Sobhi, W. (2020). Involvement of Oxidative Stress in Type 1 Diabetes. *American Journal of Biomedical Science & Research*, *6*(6), 538–543. https://doi.org/10.34297/ajbsr.2020.06.001100

Soliman, N. A. (2012). Orphan kidney diseases. In *Nephron - Clinical Practice*

(Vol. 120, Issue 4). https://doi.org/10.1159/000339785

Sona, C., Yeh, Y.-T., Patsalos, A., Halasz, L., Yan, X., Kononenko, N. L., Nagy, L., & Poy, M. N. (2022). Evidence of islet CADM1-mediated immune cell interactions during human type 1 diabetes. *Clinical Medicine*. https://doi.org/10.1172/jci

Standifer, N. E., Ouyang, Q., Panagiotopoulos, C., Verchere, C. B., Tan, R., Greenbaum, C. J., Pihoker, C., & Nepom, G. T. (2006). Identification of novel HLA-A*0201-restricted epitopes in recent-onset type 1 diabetic subjects and antibody-positive relatives. *Diabetes*, *55*(11), 3061–3067. https://doi.org/10.2337/db06-0066

Stanga, P. E., Tsamis, E., Papayannis, A., Stringa, F., Cole, T., & Jalil, A. (2016). Swept-Source Optical Coherence Tomography Angio^{TM} (Topcon Corp, Japan): Technology Review. *Developments in Ophthalmology*, *56*, 13–17. https://doi.org/10.1159/000442771

Stensland, Z. C., Magera, C. A., Broncucia, H., Gomez, B. D., Rios-Guzman, N. M., Wells, K. L., Nicholas, C. A., Rihanek, M., Hunter, M. J., Toole, K. P., Gottlieb, P. A., & Smith, M. J. (2023). Identification of an anergic BND cell-derived activated B cell population (BND2) in young-onset type 1 diabetes patients. *The Journal of Experimental Medicine*, *220*(8). https://doi.org/10.1084/jem.20221604

Stitt, A. W., Curtis, T. M., Chen, M., Medina, R. J., McKay, G. J., Jenkins, A., Gardiner, T. A., Lyons, T. J., Hammes, H. P., Simó, R., & Lois, N. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 51, pp. 156–186). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.08.001

Suarez-Pinzon, W. L., & Rabinovitch, A. (2001). Approaches to type 1 diabetes prevention by intervention in cytokine immunoregulatory circuits. In *International Journal of Experimental Diabetes Research* (Vol. 2, Issue 1, pp. 3–17). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1155/EDR.2001.3

Tabakoglu, N. T., & Celik, M. (2024). Investigation of the Systemic Immune Inflammation (SII) Index as an Indicator of Morbidity and Mortality in Type 2 Diabetic Retinopathy Patients in a 4-Year Follow-Up Period. *Medicina (Lithuania)*, *60*(6). https://doi.org/10.3390/medicina60060855

Taplin, C., & Barker, J. (2008). Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*, *41*(1), 11–18. https://doi.org/10.1080/08916930701619169

Teniente-Serra, A., Pizarro, E., Quirant-Sánchez, B., Fernández, M. A., Vives-Pi, M., & Martinez-Caceres, E. M. (2021). Identifying Changes in Peripheral Lymphocyte Subpopulations in Adult Onset Type 1 Diabetes. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.784110

Thulasingam, M., & Haeggström, J. Z. (2020). Integral Membrane Enzymes in Eicosanoid Metabolism: Structures, Mechanisms and Inhibitor Design. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 432, Issue 18, pp. 4999–5022). Academic Press. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.020

Tomita, T. (2017). Apoptosis of pancreatic β-cells in Type 1 diabetes. In *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* (Vol. 17, Issue 3, pp. 183–193). Association of Basic Medical Sciences of FBIH. https://doi.org/10.17305/bjbms.2017.1961

Topf, F., Schvartz, D., Gaudet, P., Priego-Capote, F., Zufferey, A., Turck, N., Binz, P. A., Fontana, P., Wiederkehr, A., Finamore, F., Xenarios, I., Goodlett, D., Kussmann, M., Bergsten, P., & Sanchez, J. C. (2013). The Human Diabetes Proteome Project (HDPP): From network biology to targets for therapies and prevention. In *Translational Proteomics* (Vol. 1, Issue 1, pp. 3–11). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.trprot.2013.03.002

Tsai, M. H., Pai, L. M., & Lee, C. K. (2019). Fine-tuning of type I interferon response by STAT3. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue JUN). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01448

Tsakiroglou, M., Evans, A., & Pirmohamed, M. (2023). Leveraging transcriptomics for precision diagnosis: Lessons learned from cancer and sepsis. In *Frontiers in Genetics* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1100352

Tuleta, I., & Frangogiannis, N. G. (2021). Diabetic fibrosis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1867, Issue 4). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166044

Turgut, B., & Yildirim, H. (2015). Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae The Causes of Hyperreflective Dots in Optical Coherence Tomography Excluding Diabetic Macular Edema and Retinal Venous Occlusion §. In *The Open Ophthalmology Journal* (Vol. 9).

Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. In *Nature Methods* (Vol. 13, Issue 9, pp. 731–740). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nmeth.3901

Uno, S., Imagawa, A., Okita, K., Sayama, K., Moriwaki, M., Iwahashi, H., Yamagata, K., Tamura, S., Matsuzawa, Y., Hanafusa, T., Miyagawa, J., & Shimomura, I. (2007). Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-α in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia*, *50*(3), 596–601. https://doi.org/10.1007/s00125-006-0569-9

Van Belle, T. L., Coppieters, K. T., & Von Herrath, M. G. (2011). *Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies*. https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2010.-Type

Van Der Torren, C. R., Verrijn Stuart, A. A., Lee, D. H., Meerding, J., Van De Velde, U., Pipeleers, D., Gillard, P., Keymeulen, B., De Jager, W., & Roep, B. O. (2016). Serum cytokines as biomarkers in islet cell transplantation for type 1 diabetes. *PLoS ONE*, *11*(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146649

Van Kaer, L. (2001) "Drugs from the sea: a marine sponge-derived compound prevents Type 1 diabetes.," 2001. doi: 10.1100/tsw.2001.357

Van Megen, K. M., Spindler, M. P., Keij, F. M., Bosch, I., Sprangers, F., van Royen-Kerkhof, A., Nikolic, T., & Roep, B. O. (2017). Relapsing/remitting type 1 diabetes. *Diabetologia*, *60*(11), 2252–2255. https://doi.org/10.1007/s00125-017-4403-3

Van Rampelbergh, J., Achenbach, P., Leslie, R. D., Kindermans, M., Parmentier, F., Carlier, V., Bovy, N., Vanderelst, L., Van Mechelen, M., Vandepapelière, P., & Boitard, C. (2024). First- in-human, double-blind, randomized phase 1b study of peptide immunotherapy IMCY-0098 in new-onset type 1 diabetes: an exploratory analysis of immune biomarkers. *BMC Medicine*, *22*(1). https://doi.org/10.1186/s12916-024-03476-y

Vanaki, E., Ataei, M., Sanati, M., Mansouri, P., Mahmoudi, M., Zarei, F., & Jadali, Z. (2013). Expression patterns of Th1/Th2 transcription factors in patients with guttate psoriasis. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 60(2), 163–174. https://doi.org/10.1556/AMicr.60.2013.2.7

Vendrame, F., Cataldo, D., Ciarlo, L., Umland, O., Misasi, R., & Dotta, F. (2012). In type 1 diabetes immunocompetent cells are defective in IL-16 secretion. In *Scandinavian Journal of Immunology* (Vol. 75, Issue 1, pp. 127–128). https://doi.org/10.1111/j.1365- 3083.2011.02630.x

Vignali, D., Cantarelli, E., Bordignon, C., Canu, A., Citro, A., Annoni, A., Piemonti, L., & Monti, P. (2018). Detection and characterization of CD8+ autoreactive memory Stem T cells in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, *67*(5), 936–945. https://doi.org/10.2337/db17-1390

Vigneron, N., Stroobant, V., Chapiro, J., Ooms, A., Degiovanni, G., Morel, S., Van Der Bruggen, P., Boon, T., & Van Den Eynde, B. J. (2004). An Antigenic Peptide Produced by Peptide Splicing in the Proteasome. *Science*, *304*(5670), 587–590. https://doi.org/10.1126/science.1095522

Voabil, P., Liberal, J., Leal, E. C., Bauer, J., Cunha-Vaz, J., Santiago, A. R., & Ambrósio, A. F. (2017). Calcium Dobesilate Is Protective against Inflammation and Oxidative/Nitrosative Stress in the Retina of a Type 1 Diabetic Rat Model. *Ophthalmic Research*, *58*(3), 150–161. https://doi.org/10.1159/000478784

Von Herrath, M., Sanda, S., & Herold, K. (2007). *Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease?* https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nri2192

Vujosevic, S., Bini, S., Midena, G., Berton, M., Pilotto, E., & Midena, E. (2013). Hyperreflective intraretinal spots in diabetics without and with nonproliferative diabetic retinopathy: An in vivo study using spectral domain OCT. *Journal of Diabetes Research*, *2013*. https://doi.org/10.1155/2013/491835

Vujosevic, S., Bini, S., Torresin, T., Berton, M., Midena, G., Parrozzani, R., Martini, F., Pucci, P., Daniele, A. R., Cavarzeran, F., & Midena, E. (2017). Hyperreflective retinal spots in normal and diabetic eyes B-Scan and En Face Spectral Domain Optical Coherence Tomography Evaluation. In *RETINA* (Vol. 37).

Vujosevic, S., Parra, M. M., Hartnett, M. E., O'Toole, L., Nuzzi, A., Limoli, C., Villani, E., & Nucci, P. (2023). Optical coherence tomography as retinal imaging biomarker of neuroinflammation/neurodegeneration in systemic disorders in adults and children. In *Eye (Basingstoke)* (Vol. 37, Issue 2, pp. 203–219). Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s41433-022-02056-9

Wada, J., & Makino, H. (2013). Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clinical Science*, *124*(3), 139–152. https://doi.org/10.1042/CS20120198

Waernbaum, I., & Dahlquist, G. (2016). Low mean temperature rather than few sunshine hours are associated with an increased incidence of type 1 diabetes in children. *European Journal of Epidemiology*, *31*(1), 61–65. https://doi.org/10.1007/s10654-015-0023-8

Wake, H. (2022). Role of histidine-rich glycoprotein as anti-DAMPs and therapeutic effects on DAMPs-related diseases. *Folia Pharmacologica Japonica*, *157*(6), 426–428. https://doi.org/10.1254/fpj.22074

Wang, L. xun, Zhang, S. xi, Wu, H. juan, Rong, X. lu, & Guo, J. (2019). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. In *Journal of Leukocyte Biology* (Vol. 106, Issue 2, pp. 345–358). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/JLB.3RU1018-378RR

Wang, P., Qian, H., Xiao, M., & Lv, J. (2023). Role of signal transduction pathways in IL-1β-induced apoptosis: Pathological and therapeutic aspects. In *Immunity, Inflammation and Disease* (Vol. 11, Issue 1). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/iid3.762

Wang, W., & Lo, A. C. Y. (2018). Diabetic retinopathy: Pathophysiology and treatments. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 6). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/ijms19061816

Wegeberg, A. M. L., Okdahl, T., Fløyel, T., Brock, C., Ejskjaer, N., Riahi, S., Pociot, F., Størling, J., Brock, B., & Zhang, M. (2020). Circulating Inflammatory Markers Are Inversely Associated with Heart Rate Variability Measures in Type 1 Diabetes. *Mediators of Inflammation*, *2020*. https://doi.org/10.1155/2020/3590389

Wiedeman, A. E., Muir, V. S., Rosasco, M. G., DeBerg, H. A., Presnell, S., Haas, B., Dufort, M. J., Speake, C., Greenbaum, C. J., Serti, E., Nepom, G. T., Blahnik, G.,

Kus, A. M., James, E. A., Linsley, P. S., & Long, S. A. (2020). Autoreactive CD8+ T cell exhaustion distinguishes subjects with slow type 1 diabetes progression. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(1), 480–490. https://doi.org/10.1172/JCI126595

Wilda, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Reisert, I., Utermann, G., Baier, G., & Hameister, H. (2001). *Protein kinase C isoenzyme: selective expression pattern of protein kinase C-u during mouse development*. www.elsevier.com/locate/modo

Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., & Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, *6*(5), 359–362. https://doi.org/10.1038/nmeth.1322

Wołoszyn-Durkiewicz, A., & Myśliwiec, M. (2019). The prognostic value of inflammatory and vascular endothelial dysfunction biomarkers in microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes. *Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism*, *25*(1), 28–35. https://doi.org/10.5114/pedm.2019.84710

Wong, T. Y., Sun, J., Kawasaki, R., Ruamviboonsuk, P., Gupta, N., Lansingh, V. C., Maia, M., Mathenge, W., Moreker, S., Muqit, M. M. K., Resnikoff, S., Verdaguer, J., Zhao, P., Ferris, F., Aiello, L. P., & Taylor, H. R. (2018). Guidelines on Diabetic Eye Care: The International Council of Ophthalmology Recommendations for Screening, Follow-up, Referral, and Treatment Based on Resource Settings. In *Ophthalmology* (Vol. 125, Issue 10, pp. 1608– 1622). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.04.007

Wrighten, S. A., Piroli, G. G., Grillo, C. A., & Reagan, L. P. (2009). A look inside the diabetic brain: Contributors to diabetes-induced brain aging. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* (Vol. 1792, Issue 5, pp. 444–453). https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.013

Xie, H., Zhang, C., Liu, D., Yang, Q., Tang, L., Wang, T., Tian, H., Lu, L., Xu, J. Y., Gao, F., Wang, J., Jin, C., Li, W., Xu, G., Xu, G. T., & Zhang, J. (2021). Erythropoietin protects the inner blood–retinal barrier by inhibiting microglia phagocytosis via Src/Akt/cofilin signalling in experimental diabetic retinopathy. *Diabetologia*, *64*(1), 211–225. https://doi.org/10.1007/s00125-020-05299-x

Xie, R., Li, T., Gao, H., Xie, C., Yuan, H., & Feng, Z. (2025). *Single-Cell Transcriptional Profiling Reveals Cellular Senescence and Inflammatory Persistence as Key Features of Type 1 Diabetes Partial Remission*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds

Xie, X., Li, F., Li, S., Tian, J., Chen, J. W., Du, J. F., Mao, N., & Chen, J. (2018). Application of omics in predicting anti-TNF efficacy in rheumatoid arthritis. In *Clinical Rheumatology* (Vol. 37, Issue 1, pp. 13–23). Springer London. https://doi.org/10.1007/s10067-017-3639-0

Xu, L., Xian, W., Li, J., Yao, X., & Long, Y. (2022). Purkinje cell (PC) antibody positivity in a patient with autoimmune glial fibrillary acidic protein (GFAP) astrocytopathy. *International Journal of Neuroscience*, *132*(10), 1043–1048. https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1860965

Yang, J., Wen, X., Xu, H., Torres-Chinn, N., Speake, C., Greenbaum, C. J., Nepom, G. T., & Kwok, W. W. (2017). Antigen-Specific T Cell Analysis Reveals That Active

Immune Responses to β Cell Antigens Are Focused on a Unique Set of Epitopes. *The Journal of Immunology*, *199*(1), 91–96. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601570

Yang, K., Zhang, Y., Ding, J., Li, Z., Zhang, H., & Zou, F. (2024). Autoimmune CD8+ T cells in type 1 diabetes: from single-cell RNA sequencing to T-cell receptor redirection. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1377322

Yang, X. F., Huang, Y. X., Lan, M., Zhang, T. R., & Zhou, J. (2018). Protective Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Retinal Vasculature and Cells in Streptozotocin-induced Diabetic Mice. *Chinese Medical Journal*, *131*(1), 75–81. https://doi.org/10.4103/0366- 6999.221263

Yanxia, C., Xiongyi, Y., Min, F., & Xiaoyun, K. (2024). Optical Coherence Tomography-Based Grading of Diabetic Macular Edema Is Associated with Systemic Inflammatory Indices and Imaging Biomarkers. *Ophthalmic Research*, *67*(1), 96–106. https://doi.org/10.1159/000535199

Yao, Y., Xu, X. H., & Jin, L. (2019). Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue MAR). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792

Yeo, L., Pujol-Autonell, I., Baptista, R., Eichmann, M., Kronenberg-Versteeg, D., Heck, S., Dolton, G., Sewell, A. K., Härkönen, T., Mikk, M. L., Toppari, J., Veijola, R., Knip, M., Ilonen, J., & Peakman, M. (2020). Circulating β cell-specific CD8+ T cells restricted by high-risk HLA class I molecules show antigen experience in children with and at risk of type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, *199*(3), 263–277. https://doi.org/10.1111/cei.13391

Yi, L., Swensen, A. C., & Qian, W. J. (2018). Serum biomarkers for diagnosis and prediction of type 1 diabetes. In *Translational Research* (Vol. 201, pp. 13–25). Mosby Inc. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.07.009

Yoon Kim D, & Kwon Lee J. (2022). Type 1 and 2 diabetes are associated with reduced natural killer cell cytotoxicity. Cellular Immunology, 379.

Yoshitake, T., Murakami, T., Suzuma, K., Fujimoto, M., Dodo, Y., & Tsujikawa, A. (2019). Predictor of Early Remission of Diabetic Macular Edema under As-Needed Intravitreal Ranibizumab. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-44078-6

Zakin, E., Abrams, R., & Simpson, D. M. (2019). Diabetic Neuropathy. *Seminars in Neurology*, *39*(5), 560–569. https://doi.org/10.1055/s-0039-1688978

Zhang, B., Chen, J., Zhu, Z., Zhang, X., & Wang, J. (2024). Advances in Immunomodulatory MOFs for Biomedical Applications. *Small*, *20*(11). https://doi.org/10.1002/smll.202307299

Zhang, H., Zhang, Q., Tu, J., You, Q., & Wang, L. (2023). Dual function of protein phosphatase 5 (PPP5C): An emerging therapeutic target for drug discovery. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 254). Elsevier Masson s.r.l. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115350

Zhang, Q., Fillmore, T. L., Schepmoes, A. A., Clauss, T. R. W., Gritsenko, M. A., Mueller, P. W., Rewers, M., Atkinson, M. A., Smith, R. D., & Metz, T. O. (2013). Serum proteomics reveals systemic dysregulation of innate immunity in type 1 diabetes. *Journal of Experimental Medicine*, *210*(1), 191–203. https://doi.org/10.1084/jem.20111843

Zhao, C. *et al.*, (2018) "Bioactive compounds from marine macroalgae and their hypoglycemic benefits," Feb. 01, 2018, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.tifs.2017.12.001.

Zhu, R., Xiao, S., Zhang, W., Li, J., Yang, M., Zhang, Y., Gu, X., & Yang, L. (2022). Comparison of hyperreflective foci in macular edema secondary to multiple etiologies with spectral-domain optical coherence tomography: An observational study. *BMC Ophthalmology*,*22*(1). https://doi.org/10.1186/s12886-022-02575-9

Zorena, K., Michalska, M., Kurpas, M., Jaskulak, M., Murawska, A., & Rostami, S. (2022). Environmental Factors and the Risk of Developing Type 1 Diabetes—Old Disease and New Data. In *Biology* (Vol. 11, Issue 4). MDPI. https://doi.org/10.3390/biology11040608

9. ANEXOS

Certificado del comité de ética de la investigación de Cádiz y de conformidad de la dirección de los centros hospitalarios Puerta del Mar y San Carlos.

Junta de Andalucía

Consejería de Salud y Consumo
Servicio Andaluz de Salud

D. ª MÓNICA SALDAÑA VALDERAS, COMO SECRETARIA DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE CÁDIZ,

HACE CONSTAR

Que de acuerdo con lo previsto en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica, este CEI ha revisado en su reunión de fecha 23 de febrero de 2023 el proyecto de investigación titulado **La inmunomodulación es una nueva diana terapéutica de la diabetes mellitus tipo 1. Uso de sp2-iminoglicolípidos como tratamientos inspirados en biomoléculas** (código de protocolo FIS22-01718; **n. º de registro 05.23**) presentado por D. Manuel Aguilar Diosdado como investigador principal.

Protocolo versión 2 final de 15 de febrero de 2023.
Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado versión 3 de 13 de marzo de 2023.

Y hace constar que el citado proyecto es viable.
Que presenta suficiente rigor metodológico.
Que la evaluación de costes económicos es correcta.
Que con respecto a su vertiente ética el proyecto cumple los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio.

Y que este Comité acepta que dicho estudio sea realizado en el siguiente centro por el siguiente investigador principal, correspondiendo a la Dirección del centro determinar si la capacidad y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Centro	Investigador	Servicio
Hospital Universitario Puerta del Mar	D. Manuel Aguilar Diosdado	Endocrinología

Y para que así conste, firmo la presente en Cádiz, a 17 de marzo de 2023.

CONSEJERÍA DE SALUD
Servicio Andaluz de Salud
JUNTA DE ANDALUCIA
Comité de Ética
de la investigación de Cádiz
C.I.F: Q-9150013-B

HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DEL MAR
Avenida Ana de Viya, 21 – 11009 Cádiz
Teléfono 956 00 21 00 www.hupm.com

CONFORMIDAD DE LA
DIRECCIÓN DEL CENTRO

D. Sebastián Quintero Otero, Director Gerente del Hospital Universitario Puerta del Mar y del Hospital de San Carlos y vista la aprobación del Comité de Ética de la Investigación,

C E R T I F I C A

Que conoce la propuesta realizada por D. Manuel Aguilar Diosdado, en calidad de investigador principal para que realizar el proyecto de investigación titulado **La inmunomodulación es una nueva diana terapéutica de la diabetes mellitus tipo 1. Uso de sp2-iminoglicolípidos como tratamientos inspirados en biomoléculas** (código de protocolo FIS22-01718; n. º de registro 05.23)

Protocolo versión 2 final de 15 de febrero de 2023.
Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado versión 3 de 13 de marzo de 2023.

Que acepta la realización de este estudio en el Hospital Universitario Puerta del Mar por D. Manuel Aguilar Diosdado como investigador principal.

Lo que firma en Cádiz, a 17 de marzo de 2023

