

UCH-FC
Biotecnología
P695
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**“POLIMORFISMOS DE LOS LIGANDOS 1 Y 2 DEL RECEPTOR DE
MUERTE CELULAR PROGRAMADA (PDL1 Y PDL2) EN LA DIABETES
TIPO 1: EFECTOS SOBRE LOS NIVELES CIRCULANTES DE
PROTEÍNAS DE INMUNOREGULACIÓN NEGATIVA”**

Seminario de Título
entregado a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniera en Biotecnología Molecular

CAROLINA ANDREA PIZARRO ACEVEDO

Dr. Francisco Pérez-Bravo
Director de Seminario de Título

Dr. Diego García Díaz
Co- Director de Seminario de Título

Diciembre de 2012
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. CAROLINA ANDREA PIZARRO ACEVEDO

“POLIMORFISMOS DE LOS LIGANDOS 1 Y 2 DEL RECEPTOR DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA (PDL1 Y PDL2) EN LA DIABETES TIPO 1: EFECTOS SOBRE LOS NIVELES CIRCULANTES DE PROTEÍNAS DE INMUNOREGULACIÓN NEGATIVA”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Francisco Pérez-Bravo
Director Seminario de Título

Dr. Diego García Díaz
Co-Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidenta Comisión

Dr. Álvaro Glavic Maurer
Evaluador

Santiago de Chile, Diciembre de 2012



BIOGRAFÍA



Nací en la histórica ciudad de Rancagua, en una pequeña familia compuesta por Marina y Fernando, dos padres que siempre dieron lo mejor para su hija. Estudié en el Liceo Oscar Castro, en donde se formó mi personalidad, un poco desordenada pero siempre responsable. Es ahí donde conocí a mis grandes amigas, Nathalie “la Flaca” y Tania, con las cuales pasé momentos inolvidables y que, gracias a la vida, seguimos viviendo momentos bellos. Cómo no recordar al resto de las niñas, la Bea, Claudia y Estefa, que a pesar del tiempo, siempre se encuentra un momento para revivir los tiempos del liceo. Durante el último año escolar,

conocí una carrera cuyo nombre era difícil de repetir, Ingeniería en Biotecnología Molecular, y que cautivó mi vida. Desde ese entonces se convirtió en mi objetivo y mi sueño. A pesar de lograr buenos resultados en la PSU sin haberme preparado mucho, no logré entrar a la carrera y quedé seleccionada en Medicina Veterinaria. Es aquí donde tuve que tomar una importante decisión: irme a Santiago a estudiar en lo que había quedado o quedarme en Rancagua y prepararme para dar la batalla nuevamente. Después de mucho meditarlo, tomé la decisión de quedarme y estudiar mucho para cumplir mi meta. Aunque para algunos esto sea la pérdida de un año, para mí fue todo lo contrario, pude trabajar y conocer gente maravillosa, como mi amiga Daniela, a quien quiero mucho y forma parte de las personas que llenan mi vida. Es por eso que siempre digo: “Por algo pasan las cosas” y quedarme fue la decisión correcta.

Finalmente, en una segunda instancia, pude ingresar a la carrera y sobretodo a la prestigiosa Universidad de Chile, por lo que mis padres se sintieron muy orgullosos. La vida universitaria siguió forjándome como persona, ya que tuve que pasar momentos buenos y momentos difíciles, jornadas de desvelo y momentos de distención. Sin embargo, todo esto no hubiese sido igual sin mis compañeros, con los que compartí largas noches de estudio y trabajos: la Ely, el Feño, la Caro y la Gaby, gracias a ellos todo fue más entretenido. Cómo olvidar los “City Tour” con la Nicole y el Manu en auto cuando teníamos ventanas o los memorables carretes en la casa del Nacho, con la Karina, la Pame, el Pablo y el Leo, que manera de reirme y pasarlo bien con ustedes.

A pesar de que a mitad de la carrera se me hizo difícil, tuve una nueva oportunidad de conocer gente muy buena onda. Aquí conocí a la Sole, la Lia, la Andrea y al Samuel, personas espectaculares y que me hicieron olvidar el hecho que ya no vería tan seguido a mis compañeros. Inolvidable el proyecto de Biotec general con la Sole y el Kris, jejeje y que nos sacamos un siete!!!

Al terminar los ramos, decidí “arrancar” de la facultad de Ciencias y tomé la decisión de irme a la facultad de Medicina, en donde realicé esta tesis junto al Dr. Francisco Pérez. Finalmente, estoy a un paso de cumplir mi meta, de terminar mi carrera profesional, lo que de seguro completará mi vida y la de mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a cada persona que contribuyó con un granito de arena durante mi formación profesional y la realización de este trabajo, sin embargo, este espacio es muy pequeño para hacerlo, así que tengo que ser breve.

A mi Tutor, el profe Pancho, quien confió en mí para llevar a cabo este trabajo (espero no se arrepienta) y que siempre está disponible para cualquier consulta. Agradecer sobretodo por su paciencia, porque hay que reconocer que me demoré un poco, jajaja.

A Diego, mi co-tutor, que siempre me ayudó con las correcciones y las acotaciones precisas en la tesis.

A la gente del Departamento de Nutrición, en especial a la Sra. Eli y la Karla, quienes se convirtieron en personas muy importantes para mí.

A la Fran, amigaza, con la que compartí muchos momentos entretenidos y de trabajo, haciéndonos mujer con las extracciones gigantes de RNA o las esperas por el real time. Espero que nuestra amistad se siga cultivando, te quiero fea!!!

A mis amigos biotec, por todo el apoyo y cariño durante estos 7 años, los quiero mucho!!!

A mi gente de Rancagua, con los que no pude compartir todo lo que quería por quedarme en Santiago, pero que siempre estuvieron presentes, en especial mi ahijado Fernando a quien quiero con toda mi alma.

A una de las personas más importantes de mi vida, Brian, mi compañero durante ya casi 5 años. Gracias por el apoyo, contención, ayuda y cariño, realmente has sido un pilar fundamental en este proceso. De seguro, ninguna de estas palabras pueden reflejar lo agradecida que estoy por tenerte a mi lado. Te amo.

Finalmente, agradecer a quienes mueven mi vida, mis padres. Gracias por su apoyo, comprensión y cariño. Sin ustedes este logro no hubiese sido posible, gracias a ustedes por su esfuerzo para mantenerme en la universidad, no existe cosa en el mundo con la que les pueda pagar todo lo que han hecho por mí. Los amo mucho y gracias por ser mis padres.



*... A mis abuelos Rosa, Ramón y Marina,
Quienes me miran desde lo más alto del cielo,
Con todo mi amor...*

ÍNDICE DE CONTENIDO

Biografía	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	iv
Índice de Contenido	v
Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas y Genes	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
1. Diabetes tipo 1	5
1.1. Factores Genéticos	5
1.2. Factores Ambientales	8
1.3. Autoinmunidad	9
1.4. Apoptosis	11
2. Moléculas de Coestimulación	12
3. PD-1	14
4. Ligandos de PD-1	17
4.1. PD-L1	18
4.2. PD-L2	19
5. Polimorfismos y Enfermedades Autoinmunes	20

6. Hipótesis	24
7. Objetivos	24
• Objetivo General	24
• Objetivos Específicos	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Participantes del Estudio	25
2. Diseño de Estudio	25
3. Extracción de ADN	26
4. Discriminación Alélica	26
5. Determinación Serológica de los Ligandos PD-L1 y PD-L2	28
6. Detección de Autoanticuerpos	28
7. Análisis Estadístico y Bioinformático	28
RESULTADOS	30
1. Frecuencias Genotípicas y Alélicas	30
2. Desequilibrio de Ligamiento	34
3. Haplotipos	36
4. Genotipos	37
5. Concentraciones Séricas de PD-L1 y PD-L2	40
6. Concentraciones Séricas de Autoanticuerpos	42
7. Genotipos y Ligandos	43
8. Genotipos y Autoanticuerpos	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Detalle de cada polimorfismo y las sondas de acuerdo a lo señalado en Applied Biosystems™	27
Tabla 2. Distribución del polimorfismo RS42 en pacientes con DM1 y controles sanos	30
Tabla 3. Distribución del polimorfismo RS37 en pacientes con DM1 y controles sanos	31
Tabla 4. Distribución del polimorfismo RS15 en pacientes con DM1 y controles sanos	32
Tabla 5. Distribución del polimorfismo RS96 en pacientes con DM1 y controles sanos	33
Tabla 6. Distribución del polimorfismo RS03 en pacientes con DM1 y controles sanos	33
Tabla 7. Distribución del polimorfismo RS89 en pacientes con DM1 y controles sanos	34
Tabla 8. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos RS42, RS37, RS15 y RS89 para pacientes y controles	36
Tabla 9. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos RS42, RS37 y RS15 para pacientes y controles	37
Tabla 10. Distribución de los genotipos múltiples más frecuentes en pacientes y controles	38
Tabla 11. Distribución de los genotipos múltiples más frecuentes en pacientes y controles	39
Tabla 12. Distribución de los genotipos simples más frecuentes en pacientes y controles para la combinación genotípica de RS37-RS15.	40
Tabla 13. Datos serológicos de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en pacientes con DM1 y controles	40
Tabla 14. Distribución de la presencia de autoanticuerpos en pacientes con DM1	43
Tabla 15. Datos de distribución porcentual por genotipos y concentraciones séricas de PD-L1 y PD-L2	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Línea de tiempo del proceso autoinmune que se desarrolla en la DM1	10
Figura 2. Estructura y señalización de la vía PD1	15
Figura 3. PD-1 y sus ligandos	17
Figura 4. Esquema de la estructura y polimorfismos de los genes <i>PD-L1</i> y <i>PD-L2</i>	22
Figura 5. Esquema de Desequilibrio de ligamiento para los polimorfismos RS42, RS37, RS15 y RS89	35
Figura 6. Concentración sérica de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en pacientes y controles	41
Figura 7. Datos serológicos de los ligandos en pacientes con DM1	42
Figura 8. Concentraciones de PD-L1 y PD-L2 de acuerdo a los genotipos analizados en este estudio	45
Figura 9. Distribución de autoanticuerpos por genotipo	46

LISTA DE ABREVIATURAS Y GENES

aá	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
Bcl-xL	BCL2-like 1, isoforma larga
<i>Cd274</i>	Gen que codifica para PD-L1
CD28	Cluster of differentiation 28 (receptor LT)
CD40	Proteína Coestimuladora
CDs	Células Dendríticas
CMPs	Células mononucleares Periféricas
CMV	Citomegalovirus
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
<i>CTLA-4</i>	Gen que codifica para la proteína CTLA-4
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
D'	Desequilibrio de Ligamiento
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
GAD65	Anticuerpo anti-Descarboxilasa del Ácido Glutámico
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HLA	Antígeno del Leucocito Humano
IA-2	Anticuerpo anti-Tirosina Fosfatasa Pancreática
IC	Intervalo de Confianza
ICA	Anticuerpo anti-Células β del Islote

ICOS	Moléculas coestimuladoras inducibles
IDDM	Locus 1 de la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente
IDDM12	Locus 12 de la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente
IDMM2	Locus 2 de la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente
INF- α	Interferón Alfa
INF- γ	Interferón Gamma
Ig	Inmunoglobulina
IgC	Dominio estructural constante de inmunoglobulinas
IgM	Inmunoglobulina M
IgV	Dominio estructural variable de inmunoglobulinas
IL-12	Interleuquina 12
IL-1 β	Interleuquina 1 β
IL-2	Interleuquina 2
<i>il2ra</i>	Gen que codifica para la proteína IL2R α
IL-6	Interleuquina 6
<i>INS</i>	Gen que codifica para Insulina
ITIM	Motivo de inhibición del inmuno-receptor basado en tirosina
ITSM	Motivo de cambio del inmuno-receptor basado en tirosina
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
LTc	Linfocito T citotóxico
LTh	Linfocito T helper
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
NOD	Nonobese diabetic mice

O.R.	Odds Ratio
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Proteína de muerte celular programada
<i>pdccl1</i>	Gen que codifica para la proteína PDCD1 o PD-1
<i>Pdccl1lg2</i>	Gen que codifica para PD-L2
PD-L1	Ligando 1 de PD-1
<i>PD-L1</i>	<i>Cd274</i>
PD-L2	Ligando 2 de PD-1
<i>PD-L2</i>	<i>Pdccl1lg2</i>
PD-Ls	Ligandos de PD-1
<i>ptpn22</i>	Gen que codifica para la proteína PTPN22
PTPN22	Proteína Tirosina Fosfatasa
RS03	rs7854303
RS15	rs4143815
RS37	rs2297137
RS42	rs822342
RS89	rs16923189
RS96	rs7852996
<i>RUNX1</i>	Runt-related transcription factor 1 gene
SH2DIA	Proteína IA con dominio SH2
SHP-2	Proteína Tirosina Fosfatasa con dominio SH2
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TCR	Receptor de Linfocitos T
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa

VNTR	Variable Number Tandem Repeat
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
3'UTR	Región 3' no traducible
5'UTR	Región 5' no traducible

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad de predisposición hereditaria que afecta principalmente a niños y adolescentes. Esta enfermedad se caracteriza por la destrucción progresiva de las células β del páncreas, lo que genera una disminución paulatina de la producción de insulina. La DM1 tiene una etiología compleja, en donde participan factores genéticos y ambientales, cuyas interacciones no han sido aun completamente esclarecidas. Existe una tendencia que señala que tanto la activación de mecanismos de apoptosis en la célula β , como la inhibición de estos mecanismos en las células que se tornan agresoras contra ella (linfocitos T), se encuentran alterados. El fenómeno de apoptosis ligado a las variantes genéticas de PD-1 y sus ligandos ha sido escasamente estudiado. Debido a su rol en la vía de PD-1, es que los ligandos 1 y 2 (PD-L1 y PD-L2) se han vuelto objeto de estudio en enfermedades autoinmunes. De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de tres polimorfismos de *PD-L1* y tres polimorfismos de *PD-L2* sobre los niveles séricos de estas proteínas en pacientes con DM1. Por otro lado, se realizó la construcción de haplotipos asociados a riesgo de DM1. Además los genotipos obtenidos se relacionaron con marcadores clásicos de esta enfermedad (autoanticuerpos anti-GAD65 y anti-IA2).

Los resultados muestran que para *PD-L1*, dos de los tres polimorfismos presentaron diferencias significativas en su distribución alélica (rs2297137 $p=0,035$ y rs4143815 $p=0,022$). Para *PD-L2*, solo uno de los tres polimorfismos presentó variación genotípica, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en su distribución. Por otro lado, el haplotipo CGG presentó un O.R. [95% IC]= 1,44 [1,08-1,93], en

donde se observó una frecuencia mayor en pacientes (0,44) en comparación con controles (0,36). Además se generaron genotipos combinados a partir del rs2297137 y el rs4143815, los que generaron una combinación asociada a riesgo de DM1 (GG-GG O.R.= 3,12) y una combinación asociada con protección a DM1 (AG-CC O.R.= 0,36). Por otro lado, los resultados obtenidos dan cuenta de que no hay diferencias relacionadas con las concentraciones séricas de estos ligandos ni con autoanticuerpos en DM1. De lo anterior, se puede concluir que el haplotipo CGG y el genotipo GG-GG están asociados a riesgo de padecer DM1, por lo que pueden ser utilizados como marcadores genéticos de la enfermedad en población chilena.

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is a hereditary disease that primarily affects children and adolescents. This disease is characterized by progressive destruction of pancreatic β cells, which leads to a gradual decrease in insulin production. The T1D has a complex etiology, being genetic and environmental factors involved, but the interactions between these are not yet fully elucidated so far. The activation of apoptotic mechanisms in the β cell presents a tendency to be altered. So does the inhibition of these mechanisms in the cells (T lymphocytes) which become aggressors against the β cell. The phenomenon of apoptosis related to PD-1 genetic variants and their ligands has been poorly studied. Due to its role in the PD-1 pathway, ligand 1 and 2 (PD-L1 and PD-L2) have become an interesting target of study in autoimmune diseases. According to the above, this study is aimed at determining the effect of three PD-L1 polymorphisms and three PD-L2 polymorphisms on the serum levels of these proteins in T1D patients. Along with this, T1D-related haplotypes were constructed. In addition, genotypes were related with classical markers of this disease, such as anti-GAD65 and anti-IA2 autoantibodies.

The results show that for PD-L1, two out of three polymorphisms presented significant differences in their allele distribution (rs2297137 $p = 0,035$ and rs4143815 $p = 0,022$). For PD-L2, only one out of three polymorphisms shows genotypic variation, yet no significant differences in their distribution were observed. In addition, the CGG haplotype presented an O.R. [95% CI] = 1,44 [1,08 - 1,93], being more frequently observed in patients (0,44) than in controls (0,36). Furthermore, combined genotypes were generated from rs2297137 and rs4143815. One combination was

described to be related with higher risks of T1D development (GG-GG O.R. = 3,12) and another combination with T1D protection (AG-CC O.R. = 0,36). No differences related to serum concentrations of these ligands or to autoantibodies in T1D were detected. In summary, it can be concluded that the CGG haplotype and the GG-GG genotype are highly associated with the risk of developing T1D, therefore these genetic features can be used as markers of this disease in the Chilean population.

INTRODUCCIÓN

1. Diabetes Tipo 1

La DM1 es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las células β -pancreáticas productoras de insulina de los islotes de Langerhans (Tisch & McDevitt, 1996), la cual genera hiperglicemia debido a la baja producción de esta hormona (Ounissi-Benkalha & Polychronakos, 2008). Es el trastorno endocrino-metabólico más frecuente durante la infancia y la adolescencia, con un perfil clínico que varía notablemente entre pacientes, y que al no ser tratada pronta y adecuadamente provoca serios daños al organismo, tales como: cetoacidosis, fallas renales, enfermedades cardíacas, ceguera y accidentes cerebrovasculares (van Belle y col, 2011).

Esta enfermedad posee una etiología multifactorial donde la predisposición genética y los factores ambientales juegan un papel importante en su desarrollo (Hawa y col, 2002). También se ha sugerido que podría existir una susceptibilidad étnico específica en los genes relacionados con el desarrollo de DM1 (Matsuura y col, 1998). De esta forma, se ha observado una mayor incidencia de la enfermedad en población caucásica y una incidencia menor en el resto de las otras etnias como la asiática, americana y en países con población de origen negroide (Karvonen y col, 1993).

1.1. Factores Genéticos

Entre los factores genéticos que intervienen en esta enfermedad, se ha descrito una región génica que centra todo el interés científico desde los últimos 30 años, ya que se ha relacionado fuertemente con la susceptibilidad a padecer DM1 y con la tolerancia

autogénica. Esta región corresponde a la región génica del Antígeno del Leucocito Humano (HLA) (Atkinson & Maclaren, 1994), conocida como IDDM1 (locus 1 de la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente, por sus siglas en inglés). El IDDM1 también se ha relacionado con el desarrollo de otras enfermedades autoinmunes. Se ha descrito que se ubica en el cromosoma 6p21 (Singal & Blajchman, 1973; Nerup y col, 1974), y que codifica proteínas de moléculas de superficie de tres clases distintas (I, II y III), las que pueden encontrarse en la mayoría de las células nucleadas y participar en la presentación antigénica. Las moléculas de clase I participan en la presentación de antígenos a linfocitos T citotóxicos (LTc). Las de clase II están presentes en linfocitos B (LB), macrófagos, células T activadas y células dendríticas; y presentan antígenos a linfocitos T cooperadores (LTh, por sus siglas en inglés). Por último, las moléculas de clase III forman parte de las moléculas del sistema del complemento (Trucco & Dorman, 1989).

Se ha descrito, que los genes HLA de clase II se encuentran más relacionados con la presencia de DM1 (Farid y col, 1979; Owerbach y col, 1983; Todd y col, 1987; Thorsby & Ronningen 1993; Undlien y col, 1997), siendo DR4-DQ8 y DR3-DQ2 haplotipos importantes, y se ha observado que están presentes en un 90% de los niños caucásicos con esta patología. Por otro lado, entre estos genes, se ha encontrado un haplotipo asociado a protección en DM1, el DR15-DQ6, el que se encuentra en menos de un 1% de la población diabética y en un 20% en población general (Gillespie y col, 2004).

Otro locus de susceptibilidad es el IDMM2, que se ubica en el cromosoma 11p15, en donde se encuentra un polimorfismo de secuencias repetidas en tándem de número variable (*Variable Number Tandem Repeat*, VNTR), localizado río arriba del gen de

la insulina (*INS*) (Bell y col, 1984). De acuerdo al número de repeticiones de una unidad consenso, correspondiente a 15 pares de bases ricos en guanina (G), se pueden distinguir tres clases de este polimorfismo: Clase I, con 30 a 60 repeticiones que da cuenta aproximadamente del 10% de susceptibilidad génica; Clase II, con 61 a 120 unidades, muy raro en la población; y Clase III, con 120 a 170 unidades, el cual es poco frecuente y estaría asociado a un efecto protector contra DM1, de 3 a 5 veces mayor respecto a un sujeto portador del haplotipo de Clase I (Bennett y col, 1995; Bennett y col, 1996).

Por último, existe un tercer locus conocido como IDDM12, ubicado en el cromosoma 2q33, en donde se encuentra el gen del Antígeno 4 asociado al Linfocito T Citotóxico (*CTLA-4*), el cual se conoce desde hace años debido a su papel modulador en la activación de los linfocitos T (LT) (Nistico y col, 1996).

Actualmente, la investigación de genes candidatos está dirigida hacia el descubrimiento de nuevas regiones de susceptibilidad a desarrollar DM1. Como resultado de esto, los genes *il2ra*, *ptpn22* y *pdccl1* se han asociado a un mayor riesgo de padecer DM1 (Lowe y col, 2007; Flores y col, 2010). Se ha descrito que variaciones alélicas y polimorfismos en estos genes afectan el normal funcionamiento de las proteínas codificadas, lo que se traduce en alteraciones de los mecanismos de los LT, ya sea LT reguladores (variaciones del gen *il2ra*) o LT efectores (variaciones del gen *ptpn22*). Por su parte, se ha descrito que el gen *pdccl1* es muy relevante en el reconocimiento de estructuras que regulan negativamente la unión entre células presentadoras de antígenos (CPA) y el LT, por lo que es de gran interés determinar su relación con la susceptibilidad a desarrollar DM1 y su eventual función como marcador dentro de los procesos asociados con la ruptura de la tolerancia autogénica.

1.2. Factores Ambientales

Los factores genéticos pueden interactuar y ser modulados por el ambiente, por lo que las distintas regiones génicas descritas anteriormente no son gatillantes por sí solas para el desarrollo de DM1. Dentro de los factores ambientales que facilitarían la presencia de la enfermedad se pueden encontrar: infecciones virales (Bach, 2005), toxinas y dieta (Myers y col, 2003), y la excesiva higiene (Cooke, 2009). Estos factores conducirían a la ruptura de la tolerancia autogénica normal. Algunos resultados indican que infecciones producidas por virus tales como citomegalovirus (CMV) y coxsackie B4 (Yoon y col, 1979; King y col, 1983; Wagenknecht y col, 1991) pueden producir un anticuerpo que reaccionaría con componentes específicos de la superficie beta celular en el páncreas, lo cual estaría avalando la hipótesis de la supuesta intervención de un mecanismo de mimetismo molecular, que sería responsable de la reacción autoinmune típica de la enfermedad (Santos y col, 2000). Además, estudios realizados en Estados Unidos, Europa y Australia han demostrado que la proporción de jóvenes con DM1 que portan el alelo de riesgo DR3/4 no ha cambiado en el tiempo (García & Durruty, 2003), esto es, que el factor genético se mantiene estable. Por el contrario, los estilos de vida y los factores ambientales sí han cambiado, como el clima y el crecimiento de la obesidad infantil, lo que nos indica que este factor externo sí tiene importancia sobre el inicio y desarrollo de la DM1 y posiblemente, está interactuando positivamente en su aumento a nivel mundial (Gillespie y col, 2004; Fourlanos y col, 2008; Vehik y col, 2008).

1.3. Autoinmunidad

Como se ha mencionado anteriormente, la base genética sumado a uno o más factores ambientales pueden gatillar el inicio de esta enfermedad. La Figura 1 muestra cómo se desarrolla el proceso de reacción autoinmune. En el páncreas las células β comienzan la producción de interferón α (INF- α) y, subsecuentemente, producen moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I (MHC, por sus siglas en inglés), que las deja expuestas al ataque de LT CD8⁺ autoreactivos. Producto de lo anterior, los antígenos liberados desde las células β son transportados por las CPA hacia el linfonodo pancreático. Durante este proceso se produce un ambiente proinflamatorio que favorece la acción de los LT CD8⁺ efectores por sobre la acción de los LT reguladores. En este contexto, los antígenos de las células β junto a los linfocitos CD4⁺ cooperadores favorecen la conversión de los linfocitos B en células plasmáticas, por lo tanto, comienzan a aparecer los primeros autoanticuerpos, tales como: anticuerpos anti-islotos (ICA, 70-80% de los pacientes), anti-descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, 70-80% de los pacientes) y anti-tirosina fosfatasa pancreática (IA-2, 60-80% de los pacientes)(Kukreja & Maclaren, 1999; Ounissi-Benkhalha & Polychronakos 2008). Por su parte, los LT CD8⁺ autoreactivos son estimulados, lo que genera que proliferen y vuelvan a migrar hacia el páncreas generando un nuevo ataque autoinmune con la destrucción de células β . En este punto, también se produce en paralelo la disminución en la producción de insulina por parte de las células β (pseudotrofia) (van Belle y col, 2011).

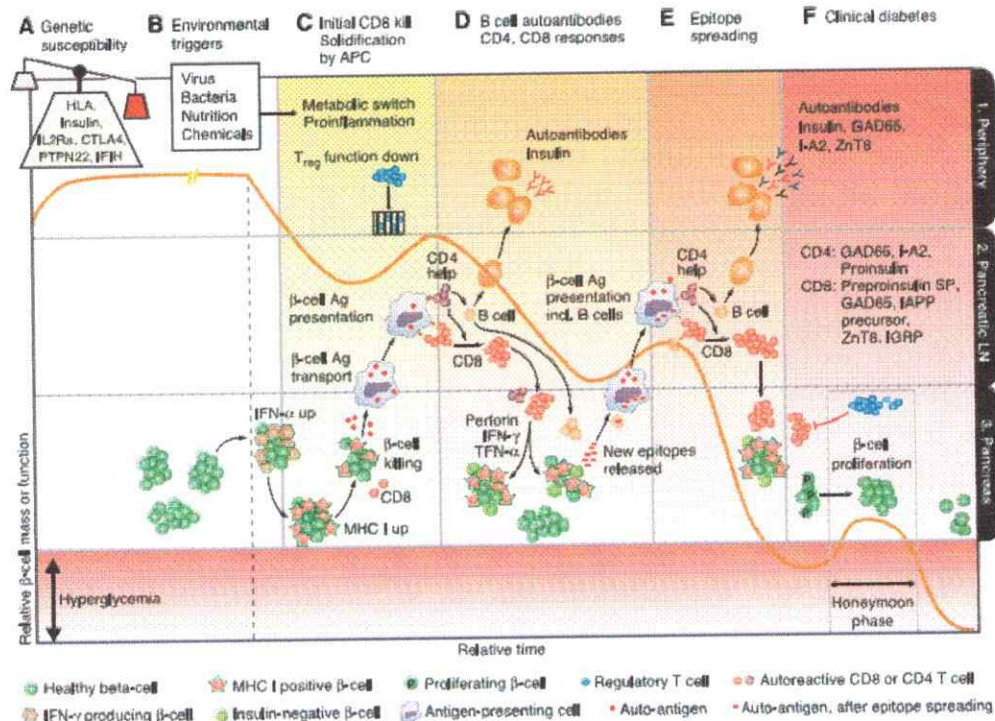


Figura 1. Línea de tiempo del proceso autoinmune que se desarrolla en la DM1.

En este diagrama se describen los principales linajes celulares involucrados, que incluye LT CD4+ y LT CD8+, LT reguladores, LB y CPA. La línea naranja indica la masa de células β pancreáticas, la disminución observada se ha descrito como un modelo de “recaída y remisión” ya que pareciera haber una recuperación de la masa celular cada ciertos lapsos de tiempo, volviendo posteriormente a disminuir. La última fase de remisión, que ocurre después del diagnóstico clínico de la enfermedad, se conoce como “luna de miel” (*honeymoon*) y ha sido ampliamente estudiada como blanco terapéutico de la enfermedad. (Extraído de van Belle y col, 2011).

Estos ataques sucesivos contra las células β van disminuyendo la masa pancreática, no obstante, es un proceso que puede tomar mucho tiempo antes de que aparezcan los primeros síntomas de la diabetes. Se estima que estos tienen lugar después de que un 80% de las células del islote pancreático están destruidas. Sin embargo, muchos autores sostienen que el progreso de la enfermedad no es un proceso lineal, sino que

procede a ritmos variables dependiendo de cada paciente (Chatenoud & Bluestone, 2007).

1.4. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada regula fisiológicamente la homeostasis de un organismo. La muerte celular es un proceso necesario para el desarrollo y existencia de organismos multicelulares. Este proceso se caracteriza por cambios morfológicos en la célula, condensación de la cromatina y fraccionamiento del ADN, el cual es seguido por la fragmentación celular y formación de cuerpos apoptóticos (Korsmeyer y col, 1995). Luego, estos cuerpos son capturados por fagocitos y, debido a que en este proceso no hay liberación del contenido celular, no se provoca respuesta inflamatoria (Savill y col, 1989; Arends & Wyllie, 1991). El proceso de apoptosis es diferente al proceso de necrosis, ya que en este último proceso la célula pierde la integridad de su membrana y libera el contenido celular, dando lugar a una respuesta inflamatoria, iniciada fundamentalmente por enzimas proteolíticas y por radicales libres (Magno & Joris, 1995).

La apoptosis es un proceso regulado genéticamente, en el cual intervienen moléculas efectoras y moléculas reguladoras. Muchas de las señales de muerte y supervivencia celular proceden del exterior de la célula a través de receptores de superficie (vías de muerte extrínsecas). Otras en cambio, por señales internas como daño en el ADN, ausencia de factores de crecimiento y citoquinas, estrés del retículo e infecciones virales (vía intrínseca o mitocondrial) (Murphy y col, 2003; Tibbetts y col, 2003).

La apoptosis está fuertemente relacionada a la DM1, ya que interviene en los mecanismos de destrucción de las células β . A su vez, también se asocia a una cierta

resistencia a la apoptosis o inhibición de estos mecanismos en las células que se tornan agresoras contra las células β , los LT (Bottazzo, 1986).

Las señales que desencadenan la apoptosis pueden provenir de las altas concentraciones de citoquinas inflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6; o de la presencia y acción de LTs en el microambiente de los islotes (Riboulet-Chavey y col, 2008). Esta presencia de células inmunes se debe al papel que juega la apoptosis en el desbalance de los LT CD8+ autoreactivos, que es provocada por la alteración de los mecanismos de proliferación y activación de estas células, cuyo proceso está regulado por moléculas de coestimulación. Estas moléculas inhiben la activación antigénica de células B y T, manteniendo así la tolerancia autogénica (Keir y col, 2008).

Otro proceso, en donde se ha descrito apoptosis, es en la eliminación de LTs potencialmente autoreactivos en el timo (Sprent & Kishimoto, 2002). Sin embargo, se ha observado que pueden existir fallas en la tolerancia central y algunos LT autoreactivos pueden escapar de este control, pasando a ser responsables de los mecanismos de tolerancia periférica (Lohmann y col, 1996). Durante este proceso, los linfocitos pueden morir por apoptosis, a través de la vía intrínseca o extrínseca, o por mecanismos independientes de caspasas (Arnold y col, 2006).

2. Moléculas de coestimulación

Dentro de la respuesta inmune existen moléculas que forman parte de vías de coestimulación que son claves para la activación y regulación de células del sistema inmune. Las moléculas de coestimulación son aquellas moléculas de superficie que no son capaces de activar de manera funcional a los LT por sí solas, sino que participan en este proceso junto a otras moléculas. Es por esto, que las moléculas de

coestimulación tienen la capacidad de amplificar o reducir la señalización inducida por el complejo del receptor de células T (TCR, por sus siglas en inglés) (Vargas-Rojas y col, 2008).

Las moléculas de coestimulación son glicoproteínas esenciales para la comunicación de los LT con el resto de las células del sistema inmune. El modelo de coestimulación descrito por Lafferty, plantea un modelo de doble señal para la activación de los LT (Lafferty & Cunningham, 1975). La primera señal, de alta especificidad, es mediada por el reconocimiento a través del TCR de un péptido antigénico unido al MHC. Por su parte, la segunda señal, coestimuladora, es entregada por las CPA generando la expansión clonal y el desarrollo de la respuesta efectora específica. Cuando esta segunda señal no se presenta, los linfocitos no responden efectivamente contra el antígeno específico y se mantienen funcionalmente inactivos o anérgicos. Además se vuelven resistentes a una posterior activación por antígeno.

Actualmente, estas moléculas no sólo se asocian a una señal de activación eficiente, sino que además se han relacionado con la dinámica de la expresión de moléculas inhibitorias, como CTLA-4, y la molécula de muerte celular programada 1 (PD-1, por sus siglas en inglés). Estas han demostrado su participación en muchos mecanismos reguladores de las células T y en la inducción de la tolerancia (Vargas-Rojas y col, 2008). Se ha descrito que PD-1 inhibe la proliferación mediada por receptor de células T, la producción de citoquinas (INF- γ) en LT previamente activados, e induce la apoptosis (Okazaki y col, 2001; Fife & Bluestone, 2008). Además de estas moléculas, también se encuentran CD28 e ICOS, las que han sido relacionados en muchas enfermedades autoinmunes incluyendo la DM1 (Marron y col, 2000).

3. PD-1

La PD-1 es una proteína que está codificada por el gen *pdc1*, localizado en humanos en el cromosoma 2 (2q37.3). Este gen consta de cinco exones. El primer exón codifica para una secuencia señal corta, el segundo exón codifica el dominio globular, el tercero la región transmembrana y una porción del tallo extracelular, el cuarto exón una secuencia corta de 12 aa (Johansson y col, 2005) que marca el inicio del dominio citoplasmático, y el exón 5 codifica la secuencia de los residuos intracelulares carboxilo terminal y la región no transcrita en el 3' (3'UTR). Es una proteína de 288 aa de longitud, compuesta por un dominio extracelular perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas (Ig), un dominio transmembrana y un dominio intracelular de aproximadamente 95 aa que contiene un motivo de inhibición del inmuno-receptor basado en tirosina (ITIM, por su nombre en inglés) y un motivo de cambio del inmuno-receptor basado en tirosina (ITSM, por su nombre en inglés) que permite la unión de moléculas adaptadoras con dominios SH2 como la proteína IA (SH2DIA)(Keir y col, 2008) (Figura 2).

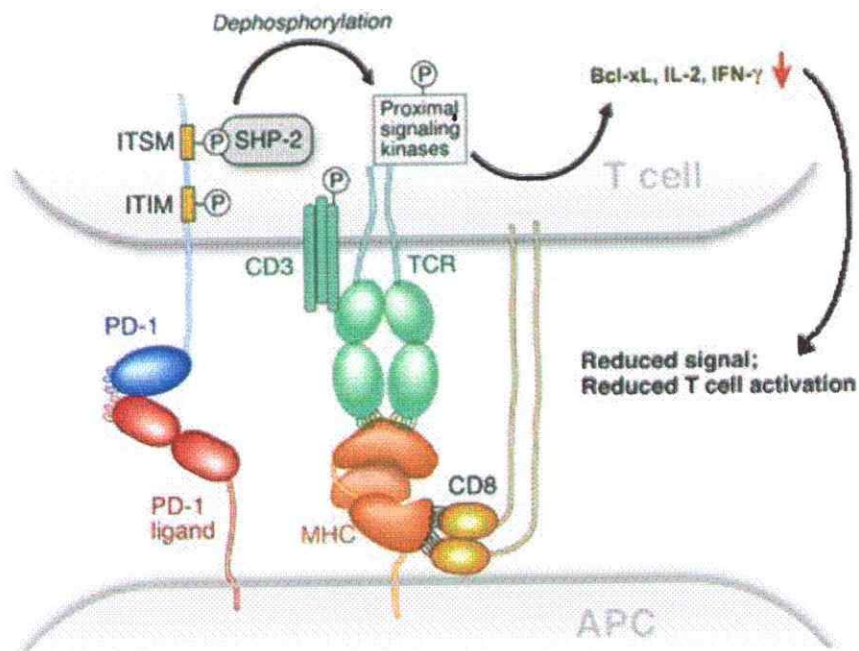


Figura 2. Estructura y señalización de la vía PD-1. La unión de PD-1 a su ligando en la superficie celular conduce a la fosforilación de las tirosinas citoplasmáticas de PD-1 e incrementa la asociación de SHP-2 con el dominio ITSM de PD-1. El reclutamiento de SHP-2 puede desfosforilar vías de señalización a través de quinasas y las señales de río abajo de estas moléculas. Finalmente PD-1 disminuye la inducción de citoquinas, tales como $\text{INF-}\gamma$, y proteínas de supervivencia celular, como Bcl-xL. (Modificado de Freeman, 2008).

Se han clonado variantes de los transcritos de PD-1 desde células T activadas, los cuales pueden carecer del exón 2, exón 3, exones 2 y 3 o exones 2 a 4. Todas estas variantes, excepto la que carece del exón 3, poseen niveles similares de expresión de la proteína PD-1 completa en las demás células mononucleares periféricas (CMPs) (Keir y col, 2008).

PD-1 puede ser expresada en células T, células B, células T *natural killer*, monocitos activados y células dendríticas (CDs). No es expresada en el resto de las células T, pero puede ser inducida después de la activación (Nishimura y col, 1996).

Cuando esta molécula interactúa con sus ligandos, envía señales intracelulares que son traducidas en la disminución de la producción de citoquinas como INF, TNF e IL-2. Esta vía tiene efectos sobre la diferenciación y supervivencia celular, a través de la inhibición temprana de las señales de activación por medio de CD28, o de manera indirecta a través de IL-2. Estas moléculas, IL-2 y CD28, promueven la expansión y supervivencia natural a través de efectos anti-apoptóticos sobre el ciclo celular y sobre la activación de los genes de citoquinas implicadas en estos procesos (Vargas-Rojas y col, 2008).

Se ha propuesto que PD-1 cumple un papel importante en la mantención de la tolerancia periférica, ya que estudios realizados con ratones *knockout* para PD-1 mostraron que éstos desarrollaron artritis y glomerulonefritis (Nishimura y col, 1999) o en otros casos cardiomiopatía dilatada (Nishimura y col, 2001). En humanos se ha encontrado que los niveles de expresión de ARNm de PD-1 en células T CD4⁺ en pacientes con DM1 es significativamente menor que en los controles (Tsutsumi y col, 2006).

En resumen, PD-1 es una molécula de coestimulación que genera una señal inhibitoria, siendo un importante regulador negativo de la activación de las células T y que por tanto, participa en el mantenimiento de la tolerancia periférica.

4. Ligandos de PD-1

Los ligandos de PD-1 son PD-L1 y PD-L2, conocidos también como B7-H1 y B7-DC respectivamente. Pertenecen a la familia de glicoproteínas de transmembrana de tipo 1 con dominios extracelulares tipo IgV e IgC (Figura 3).

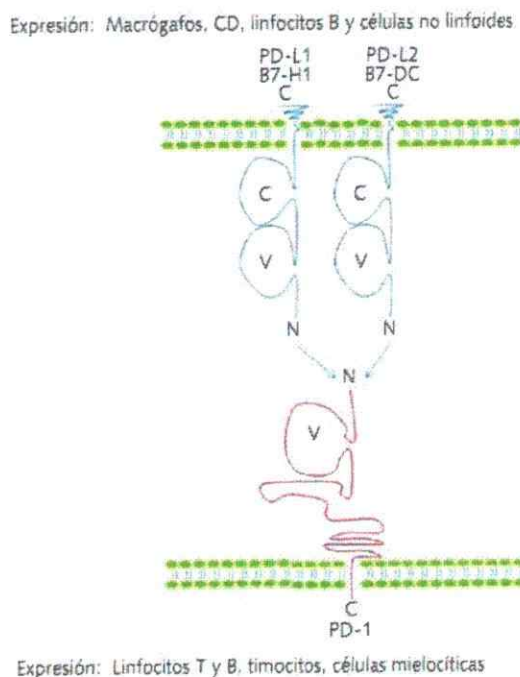


Figura 3. PD-1 y sus ligandos. La unión entre estas moléculas regula negativamente la respuesta inmune. Los dominios globulares IgV e IgC, se representan como V y C respectivamente (Extraído de Vargas-Rojas y col, 2008).

Una gran variedad de tejidos pueden expresar normalmente los transcritos de ambos ligandos. Se han observado altos niveles de expresión en placenta, corazón, pulmón e hígado; bajos niveles de expresión en bazo, ganglios linfáticos y timo; y no se han observado transcritos en el cerebro. Sin embargo, la cantidad de estos ARNm no siempre se correlacionan con la cantidad de proteínas. Este hecho se ha observado

especialmente para PD-L2, la cual se detecta ocasionalmente en condiciones normales en órganos no linfoides, lo que sugiere una regulación postranscripcional de este ligando (Vargas-Rojas y col, 2008).

4.1. PD-L1

La molécula PD-L1 es una proteína que consta de 290 aá y que es codificada por el gen *Cd274* localizado en el cromosoma 9 humano. Contiene siete exones, donde el primer exón es no codificante y contiene la región 5'UTR. Los siguientes tres exones corresponden a la secuencia señal, un dominio tipo IgV y otro dominio tipo IgC. Los exones 5 y 6 corresponden al dominio transmembrana y al dominio intracelular, respectivamente. El último exón contiene residuos del dominio intracelular y la región 3'UTR. El dominio intracelular es pequeño, constando tan solo con 30 aá altamente conservados en todas las especies reportadas (Keir y col, 2008). Existe una única variante de PD-L1 en humanos que carece del dominio tipo IgV codificado por el exón 2. Aunque aún no se reporta su función, ésta tendría relación con la incapacidad de la molécula para unirse a PD-1 (He y col, 2005).

Se ha evaluado la expresión de los ligandos de PD-1 en modelos murinos, y de acuerdo con los reportes, PD-L1 se expresa constitutivamente en células B y T, macrófagos y CDs. También se ha encontrado en células troncales mesenquimáticas y mastocitos derivados de la médula ósea (Yamazaki y col, 2002). La expresión de PD-L1 es sobrerregulada en respuesta a varios estímulos, como anticuerpos anti-IgM, anti-CD40, anti-CD3, INFs, IL-4, IL-12 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por su nombre en inglés) (Vargas-Rojas y col, 2008).

La expresión de PD-L1, tanto en tejidos linfoides como no linfoides, sugiere que la vía PD-1/PD-L1 puede modular las respuestas inmunes en órganos linfoides secundarios y en los órganos blancos (Vargas-Rojas y col, 2008).

4.2. PD-L2

La molécula PD-L2 es una proteína que se codifica en el gen *Pcd11g2* adyacente al gen *Cd274*. Estos genes están separados por sólo 42 kb en humanos. El gen comprende siete exones en humanos, en donde el exón 1 es no codificante, el exón 2 codifica la secuencia señal, los exones 3 y 4 codifican los dominios IgV e IgC, respectivamente, y el exón 5 contiene un pequeño tronco correspondiente a la región transmembrana y el comienzo del dominio citoplasmático. En el exón 6 y 7 hay una región codificante adicional que genera un dominio citoplasmático de 30 aa. Este dominio no presenta motivos de señalización apreciables pero está conservado en diversas especies, lo que podría indicar que tiene un papel funcional (Keir y col, 2008).

Se han reportado tres variantes de PD-L2: una de ellas elimina el exón del dominio tipo IgV perdiendo su capacidad de unirse a PD-1; otra variante llamada de tipo II carece del dominio IgC, y se espera que se una a PD-1, ya que la mayor actividad de unión se encuentra en el dominio IgV; y finalmente, una tercera variante denominada tipo III, que pierde el dominio IgC y residuos transmembrana, y que de esta manera puede generar una forma soluble del ligando.

La expresión de PD-L2 es más restringida que la de PD-L1, ya que es inducible en CD8, macrófagos y mastocitos derivados de la médula ósea. PD-L2 también puede ser inducido en monocitos y macrófagos por GM-CSF, IL-4 e INF- γ (Keir y col, 2008).

5. Polimorfismos y Enfermedades Autoinmunes

La señal negativa generada a través de la vía PD-1/PD-Ls es muy relevante en el control de las enfermedades autoinmunes, limitando la función efectora de las células T y constituyendo un importante mecanismo de regulación intrínseca. La deficiencia de PD-1, que se ha observado en modelos murinos, lleva al desarrollo de enfermedades autoinmunes después de un período de meses y presenta una distribución órgano específica. Se ha descrito que ratones de la cepa BALB/c deficientes de PD-1 (PD-1^{-/-}) desarrollan cardiomiopatía autoinmune (Nishimura y col, 2001), mientras que los C57BL/6 PD-1^{-/-} desarrollan artritis y glomerulonefritis lúpica (Nishimura y col, 1999), y los NOD (*nonobese diabetic mice*, por sus siglas en inglés) PD-1^{-/-} presentan diabetes autoinmune de forma acelerada (Wang y col, 2005).

En el gen *pdccl1* se han descrito muchos polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) que confieren susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes en humanos. Se han reportado unos 30 polimorfismos, de los cuales 20 se localizan en las regiones intrónicas del gen estructural (Vargas-Rojas y col, 2008). Al menos 10 SNPs ya se han estudiado en asociación con enfermedades autoinmunes, sin embargo, los resultados varían dependiendo de la población en análisis (Okazaki & Wang, 2005). Dentro de estas enfermedades se encuentra el lupus eritematoso sistémico (Prokunina y col, 2002; Nielsen y col, 2004; Sanghera y col, 2004; Johansson y col, 2005), esclerosis múltiple (Kroner y col, 2005), la artritis reumatoide (Lin y col, 2004; Prokunina y col, 2004; Kong y col, 2005) y la DM1 (Nielsen y col, 2003).

Algunos de los SNPs más estudiados son: PD-1.1, localizado en la región promotora (posición -531 relativa al sitio de inicio de transcripción); PD-1.2, localizado en el intrón 2 (posición 6,438); PD-1.3, localizado en el intrón 4 (posición 7,146); PD-1.4, en el intrón 4 (posición 7,499); PD-1.9, en el exón 5 (posición 7,625, sustitución Ala/Val); PD-1.5, en el exón 5 (posición 7,785, ala/ala); y PD-1.6, en la posición 32 de la región no traducida (posición 8,735). Se han descrito diferentes haplotipos de estos SNP en familias caucásicas y se sabe que PD-1.1, PD-1.2 y PD-1.9 están en desequilibrio de ligamiento, mientras que las posiciones PD-1.4 y PD-1.5 forman un bloque diferente (Prokunina y col, 2002). En Chile, de un estudio caso-control basado en los polimorfismos PD-1.2, PD-1.5, PD-1.6 y PD-1.9, solo se observaron resultados significativos para PD-1.6, describiéndose una posible asociación del genotipo G/G con DM1 (Flores y col, 2010).

Estudios previos usando anticuerpos anti-PD-L1 y anti-PD-L2 demuestran que el bloqueo de la vía PD-1-PD-Ls se relaciona con el desarrollo de enfermedades autoinmunes. El bloqueo de PD-L1 desencadena rápidamente diabetes en hembras pre-diabéticas NOD (Ansari y col, 2003), mientras que el bloqueo de PD-L2 induce en animales un aumento de presencia de encefalomielitis experimental autoinmune (Salama y col, 2003).

También se han descritos diversos SNPs en los ligandos de PD-1, los cuales pueden resultar en sustituciones de aminoácidos, cambios estructurales y diferencias en la expresión, lo que podría afectar y cambiar las interacciones entre PD-L1 o PD-L2 y PD-1 (Kong y col, 2005). Por lo tanto, es posible relacionar estos polimorfismos a la patogénesis de las enfermedades autoinmunes. Así, para PD-L1 se han descrito numerosos polimorfismos (Ni y col, 2007; Wang y col, 2007a; Hayashi y col, 2008;

Mitchell y col, 2009), de los cuales algunos ya han sido relacionados a enfermedades autoinmunes, como por ejemplo, enfermedad de Graves (Hayashi y col, 2008) y Addison (Mitchell y col, 2009). Por otro lado, otro estudio ha demostrado que polimorfismos en PD-L2 se asocian con susceptibilidad de padecer lupus eritematoso sistémico (Wang y col, 2007b).

Respecto a los estudios realizados con estos polimorfismos destaca el realizado por Ni y col, en población japonesa (Ni y col, 2007). En este trabajo fueron analizados 8 SNPs para PD-L1 y 9 SNPs para PD-L2 (Figura 4) obteniéndose resultados muy variados, que de acuerdo a lo señalado, dependen de una confirmación posterior con un tamaño muestral mayor.

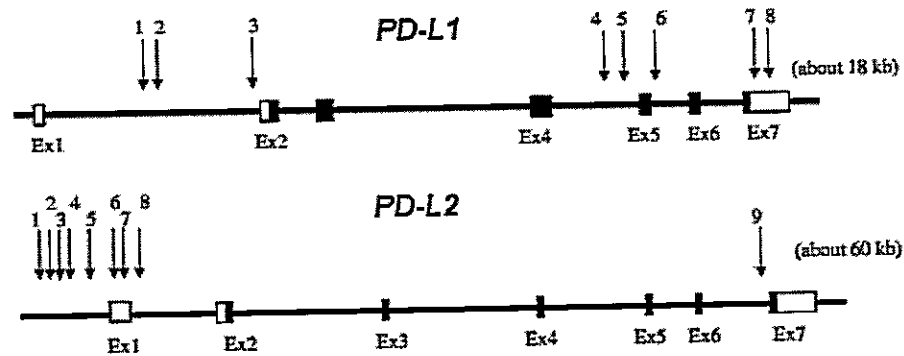


Figura 4. Esquema de la estructura y polimorfismos de los genes *PD-L1* y *PD-L2*. Los polimorfismos se muestran en números, los exones codificantes en bloques negros, los exones no codificantes en bloques blancos y las regiones intrónicas se muestran como líneas (Extraído de Ni y col, 2007).

Los estudios genéticos de estos ligandos realizados previamente sobre susceptibilidad a la DM1 no han arrojado resultados significativos hasta ahora. Debido al papel que cumplen ambos ligandos dentro de la vía de PD-1 y su relación con la mantención de la tolerancia periférica, se hace relevante realizar un análisis genético fino de esta región. Esto se puede realizar mediante la construcción de distintos haplotipos, de la determinación de expresión génica y secreción de estos ligandos, y de su asociación con el desarrollo de fenotipo DM1 en humanos. Estos análisis nos ayudarían a evaluar el papel de estos ligandos dentro de la generación de respuesta autoinmune y su potencial como marcador genético de esta enfermedad.

6. Hipótesis

Existe asociación entre los polimorfismos en los genes ligandos del receptor de muerte celular programada (PD-L1 y PD-L2) y los niveles séricos de estas proteínas con mayor susceptibilidad a DM1 en población chilena.

7. Objetivos

Objetivo general

- Determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de tres polimorfismos de *PD-L1* (rs822342, rs2297137 y rs4143815) y tres polimorfismos de *PD-L2* (rs16923189, rs7852996 y rs7854303) en población diabética tipo 1 y controles sanos de la Región Metropolitana.

Objetivos específicos

- Construir haplotipos de riesgo y/o protección a partir de los polimorfismos de *PD-L1* y *PD-L2*.
- Asociar genotipos con niveles séricos de los ligandos *PD-L1* y *PD-L2*.
- Determinar la posible asociación entre genotipos de riesgo y/o protección (*PD-L1* y *PD-L2*) con marcadores de autoinmunidad clásicos de la DM1

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Participantes del Estudio

En este estudio participaron 205 pacientes debutantes con DM1 de la Región Metropolitana, con un rango etario de 6 meses - 17 años, provenientes del Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI) del Hospital San Borja Arriarán. El diagnóstico de DM1 fue realizado en base al criterio utilizado por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) (Silverstein y col, 2005). Las muestras de sangre fueron colectadas en el centro hospitalario, previa firma de consentimiento informado por los padres del probando y/o asentimiento informado por parte de los niños mayores de 10 años. Además, en este estudio se utilizaron muestras de 205 controles sanos. Estos procedimientos se encuentran aprobados por los comités de ética del Hospital San Borja Arriarán (Servicio de Salud Medicina Central) y Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

2. Diseño de Estudio

Para estudiar la posible asociación entre los polimorfismos de los ligandos PD-L1 y PD-L2 con prevalencia de DM1, se realizó un estudio del tipo caso-control con el fin de estimar la posible diferencia en el patrón de desequilibrio de ligamiento entre el grupo de niños enfermos versus el grupo control. A partir de este estudio también se realizó un análisis de asociación directa para establecer la posible existencia de haplotipos de riesgo.

3. Extracción de ADN

De cada uno de los participantes de este estudio se colectaron aproximadamente 5 mL de sangre periférica, la cual fue centrifugada a 275 g en centrífuga clínica para separar el suero de las partículas en suspensión (eritrocitos, linfocitos y plaquetas principalmente). Se almacenaron 500 µL del suero de cada muestra para análisis posteriores de citoquinas y anticuerpos, mientras que las células precipitadas fueron sometidas al proceso de extracción de ADN con el método de Chomczynski. Para ello se mezcló el residuo o "pellet" con tampón de lisis (sacarosa 0,32 M; Tris 10 mM pH 7,5; MgCl₂ 5 mM; Tritón X-100 1%) en proporción 1:5 y luego se centrifugó a 1900 g durante 10 minutos. Después de repetir este proceso 3 veces se resuspendió el residuo lisado con 1 mL de solución de Chomczynski (CH₅N₃ x HSCN + H₂O, Winkler Ltda., Santiago, Chile). Luego de 1 hora se agregaron 4 mL de etanol absoluto frío y se centrifugó a 1900 g durante 3 minutos. Este proceso se repitió 3 veces. Finalmente el residuo se dejó secar y se rehidrato con 150 µL de NaOH 8 mM. El ADN obtenido fue analizado en un equipo GeneQuant (Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra) para obtener su concentración y nivel de pureza.

4. Discriminación Alélica

Cada muestra de ADN se sometió a genotipificación por medio de sondas TaqMan® a través de la reacción de PCR en tiempo real siguiendo las condiciones indicadas por el fabricante (Ensayo TaqMan Prediseñadas para Genotipificar SNP, Applied Biosystems, California, EEUU), en un equipo Agilent Mx3005P (Agilent Technologies, California, EEUU). Este ensayo está basado en la capacidad de ligar sondas fluorescentes a secuencias específicas del ADN, específicamente una sonda

para cada alelo. Cada secuencia, además de estar unida a un fluoróforo, está unida a un apagador, por lo que en este estado no emite fluorescencia. Una vez que la secuencia específica de la sonda, para el alelo determinado, se une a su secuencia homóloga en el ADN de interés, la acción de la ADN polimerasa durante la PCR separa tanto a la sonda como al apagador de la secuencia, produciéndose así la fluorescencia que es detectada por el equipo. Las sondas y sus especificaciones generales se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Detalle de cada polimorfismo y las sondas de acuerdo a lo señalado en Applied Biosystems™.

Ligando (GEN)	SNP	Ubicación	Tipo	Polimorfismo	Secuencia Contexto Sondas [VIC/FAM]
PD-L1 (CD274)	rs822342	Chr.9: 5453973	Intrón, Sustitución Transición, Intragénico	C/T	TGCTCCCTGGGTGAGA GTGATGAAA[C/T]AGT AGGGGATTTTCCCCTT CTTTC
	rs2297137	Chr.9: 5465732	Intrón, Sustitución Transición, Intragénico	A/G	TGCAAAGGCATTCCAC TGITCAACA[A/G]CAA TTATATTGAAGCTGAG TGGGAT
	rs4143815	Chr.9: 5468257	3'UTR, Sustitución Transversión, Intragénico	C/G	TTGCCTCCTCAATG CCTCAATTT[C/G]TTTT CTGCATGACTGAGAGT CTCAG
PD-L2 (PDCD1 LG2)	rs16923189	Chr.9: 5510644	5'UTR, Sustitución Transición, Intragénico	A/G	TTACCCATCCTCATAT GTCCCAGCT[A/G]GAA AGAATCCTGGGTTGGA GCTACT
	rs7852996	Chr.9: 5569860	Intrón, Sustitución Transversión, Intragénico	A/T	CGGCTTCCAGCTAGAT GAACTTTTT[A/T]AAA AAAATTAGTTCCTCAC TCAAAT
	rs7854303	Chr.9: 5557672	Mutación <i>Mis-sense</i> , Sustitución Transición, Intragénico	C/T	TGGCTGCTTCACATTT TCATCCCCT[C/T]CTGC ATCATTGCTTTTCATTTT CATA

5. Determinación Serológica de los Ligandos PD-L1 y PD-L2

Las concentraciones séricas de PD-L1 y PD-L2 fueron realizadas por el Servicio de Inmunología de la Universidad Complutense (Hospital 12 de Octubre, Madrid, España), perteneciente al Laboratorio de Inmuno-genética a cargo del Dr. Jorge Martínez-Lazo. Los sueros fueron enviados a una temperatura de -20°C para su conservación. Para las determinaciones de cada ligando se utilizó un volumen de 30 μL de suero por muestra. Las determinaciones de PD-L1 se realizaron mediante ELISA, utilizando un kit comercial obtenido de antibodies-online Inc. (Atlanta, EEUU) con coeficientes de variación intraensayo de 1,56% e interensayo de 4,28%. Por otro lado, la determinación para PD-L2 se realizó con un kit de ELISA en experimentación, por lo que los datos obtenidos se encuentran en validación. Los coeficientes de variación en este ensayo son: 3,67% intraensayo y 5,8% interensayo.

6. Detección de Autoanticuerpos

La presencia de anticuerpos anti-GAD65 y anti-IA2 fue determinada mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) con el uso de kits comerciales Medizym® anti-IA2 y Medizym® anti-GAD (Medipan GmbH, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la determinación de anti-GAD65 se utilizó un volumen de 25 μL y para anti-IA2 se utilizó 50 μL de suero, previamente almacenados a -20°C . La detección de anticuerpos se llevó a cabo de manera semicuantitativa tomando como referencia el valor de 5 UI/mL para GAD65 y 10 UI/mL para IA2. Aquellas muestras con un título mayor o igual a dicho valor fueron consideradas “muestras positivas”.

7. Análisis Estadístico y Bioinformático

Las comparaciones de frecuencia alélicas y genotípicas entre casos y controles fueron analizadas mediante la prueba estadística de χ^2 , la cual también se utilizó para evaluar la concordancia de las frecuencias genotípicas con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Para la construcción de haplotipos se utilizó el programa SHEsis (URL: <http://202.120.7.14/analysis/myAnalysis.php>) (Li y col, 2009). Además, este programa entregó los datos acerca del desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos analizados.

Para la realización de comparaciones entre los distintos grupos de datos se utilizaron herramientas estadísticas distintas dependiendo del tipo de distribución de las variables. En el caso de variables con distribución normal se usó estadística paramétrica (t-Student), y los resultados fueron expresados como media \pm DE. Para las variables sin distribución normal los valores fueron expresados como mediana y rango, utilizándose la prueba estadística U de Mann-Whitney para su análisis. El programa utilizado fue GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc. San Diego CA, EEUU).

RESULTADOS

1. Frecuencias Genotípicas y Alélicas

Se compararon las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas para los tres polimorfismos de PD-L1 y para los tres polimorfismos de PD-L2. Para facilitar la lectura y diferenciación de cada SNP, se les reasignó un nombre a cada uno, quedando de la siguiente forma: RS42 (rs822342), RS37 (rs2297137) y RS15 (rs4143815) para los polimorfismos de PD-L1; y RS89 (rs16923189), RS96 (rs7852996) y RS03 (rs7854303) para los polimorfismos de PD-L2.

Los datos de frecuencia obtenidos para PD-L1 se encuentran en las tablas 2, 3 y 4. En el caso del polimorfismo RS42 (Tabla 2), el alelo C presenta una mayor frecuencia que el alelo T tanto en pacientes como controles, pero con una marcada tendencia hacia DM1 (0,64). También se puede observar que hay un leve aumento de la frecuencia del alelo T en los controles (0,41). Sin embargo, ninguna de las diferencias encontradas en este SNP es estadísticamente significativa.

Tabla 2. Distribución del polimorfismo RS42 en pacientes con DM1 y controles sanos.

Frecuencias Genotípicas	Pacientes (n=195)		Controles (n=192)		Valor p
	N	F	N	F	
CC	80	0,41	67	0,35	0,3181
CT	91	0,47	93	0,48	
TT	24	0,12	32	0,17	
Valor p Hardy-Weinberg	0,809		0,977		
Frecuencias Alélicas					0,1334
C	251	0,64	227	0,59	
T	139	0,36	157	0,41	
OR [95% IC]	1,2489 [0,9341~1,6698]				

La Tabla 3 muestra los datos para el polimorfismo RS37, en donde se observa mayor frecuencia del alelo G en pacientes con DM1 (0,73) y en controles (0,66) en comparación con el alelo A. Sin embargo, al comparar el alelo A entre pacientes y controles, se puede ver un aumento en la frecuencia en controles sanos (0,34). Las diferencias alélicas encontradas son estadísticamente significativas.

Tabla 3. Distribución del polimorfismo RS37 en pacientes con DM1 y controles sanos.

Frecuencias Genotípicas	Pacientes (n=197)		Controles (n=195)		Valor p
	N	F	N	F	
AA	17	0,09	24	0,12	0,1126
AG	72	0,36	84	0,43	
GG	108	0,55	87	0,45	
Valor p Hardy-Weinberg	0,320		0,600		
Frecuencias Alélicas					0,0346*
A	106	0,27	132	0,34	
G	288	0,73	258	0,66	
OR [95% IC]	0,7194 [0,5298~0,9768]				

* p<0,05.

Para el polimorfismo RS15 (Tabla 4), la distribución alélica entre pacientes y controles es diferente. Se encontró un aumento en la frecuencia del alelo G para los pacientes con DM1 (0,57), mientras que para los controles sanos hay un leve aumento en la frecuencia del alelo C (0,52). Estas diferencias son estadísticamente significativas.

Tabla 4. Distribución del polimorfismo RS15 en pacientes con DM1 y controles sanos.

Frecuencias Genotípicas	Pacientes (n=195)		Controles (n=194)		Valor p
	N	F	N	F	
CC	46	0,24	56	0,29	0,0586
CG	77	0,39	88	0,45	
GG	72	0,37	50	0,26	
Valor p Hardy-Weinberg	0,006 ^a		0,200		
Frecuencias Alélicas					0,0218*
C	169	0,43	200	0,52	
G	221	0,57	188	0,48	
OR [95% IC]	0,7188 [0,5420~0,9534]				

* p<0,05; ^a no está en equilibrio H-W.

Todas las poblaciones en estudio se comportan de acuerdo al equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) con excepción de los pacientes en el polimorfismo RS15 (p=0,006). Para las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo, no se encontraron diferencias significativas.

Los resultados obtenidos para PD-L2 se muestran a continuación en las tablas 5, 6 y 7. Con respecto al polimorfismo RS96 (Tabla 5), no presentó variación genotípica, fijándose en el genotipo AT. Por otro lado, las frecuencias genotípicas no tienen distribución H-W.

Tabla 5. Distribución del polimorfismo RS96 en pacientes con DM1 y controles sanos.

Frecuencias Genotípicas	Pacientes (n=182)		Controles (n=173)		Valor p
	N	F	N	F	
AA	0	0,00	0	0,00	1
AT	182	1,00	173	1,00	
TT	0	0,00	0	0,00	
Valor p Hardy-Weinberg	0,0		0,0		
Frecuencias Alélicas					1
A	182	0,50	173	0,50	
T	182	0,50	173	0,50	
OR [95% IC]	1,0000 [0,7450~1,3422]				

El polimorfismo RS03 (Tabla 6) no presenta variación genotípica al igual que el RS96, fijándose en el genotipo CC. En relación a las frecuencias genotípicas, no tienen distribución H-W.

Tabla 6. Distribución del polimorfismo RS03 en pacientes con DM1 y controles sanos.

Frecuencias Genotípicas	Pacientes (n=197)		Controles (n=193)		Valor p
	N	F	N	F	
CC	197	1,00	193	1,00	-
CT	0	0,00	0	0,00	
TT	0	0,00	0	0,00	
Valor p Hardy-Weinberg	-		-		
Frecuencias Alélicas					-
C	394	1,00	386	1,00	
T	0	0,00	0	0,00	
OR [95% IC]	-				

Por último, en la Tabla 7 se observa que en el SNP RS89 existe un leve aumento de la frecuencia del alelo G en pacientes y controles (ambos 0,51). En relación al equilibrio H-W, la frecuencia de pacientes y controles en el RS89 se distribuyen de acuerdo a las frecuencias esperadas, por lo que ambos grupos se encuentran en equilibrio.

Tabla 7. Distribución del polimorfismo RS89 en pacientes con DM1 y controles sanos.

Frecuencias Genotípicas	Pacientes (n=183)		Controles (n=192)		Valor p
	N	F	N	F	
AA	44	0,24	46	0,24	0,9973
AG	91	0,50	95	0,49	
GG	48	0,26	51	0,27	
Valor p Hardy-Weinberg	0,946		0,892		
Frecuencias Alélicas					0,9543
A	179	0,49	187	0,49	
G	187	0,51	197	0,51	
OR [95% IC]	1,0084 [0,7572~1,3429]				

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cada una de las frecuencias genotípicas analizadas en los polimorfismos de PD-L2.

2. Desequilibrio de Ligamiento

Se determinó el desequilibrio de ligamiento (D') entre pares de polimorfismos analizados (Figura 5). Sin embargo, dentro de este análisis no fueron considerados los polimorfismos RS96 y RS03 debido a que no se observó variación genotípica.

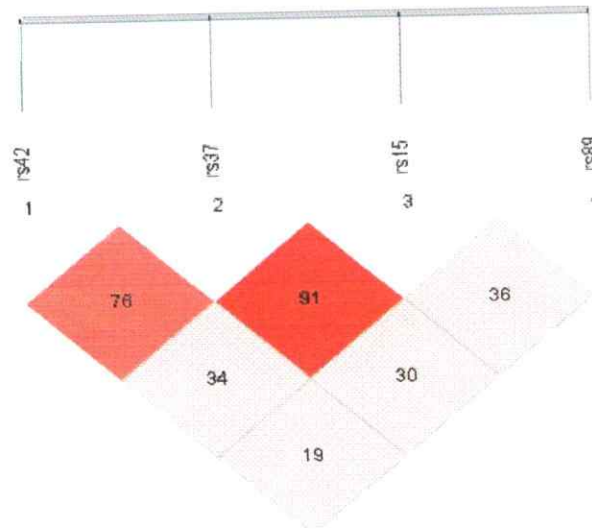


Figura 5. Esquema de Desequilibrio de ligamiento para los polimorfismos RS42, RS37, RS15 y RS89. Los números dentro de las casillas indican el valor de desequilibrio (D') que va desde 0-1 (0-100). El color rojo indica la cercanía con el ligamiento perfecto (valor 1), en cambio colores menos rojos señalan alejamiento a este ligamiento perfecto. Extraído de los resultados obtenidos con el programa SHEsis.

Como se muestra en la Figura 5, fueron detectados dos valores de D' importantes que indican que estos polimorfismos están ligados en el cromosoma. Entre los polimorfismos RS42 y RS37 se observa un valor de $D'=0,76$, mientras que para los polimorfismos RS37 y RS15 se reporta un valor mucho más alto, acercándose al ligamiento perfecto ($D'=0,91$). Por lo tanto, el polimorfismo RS37 tiene una alta probabilidad de segregarse junto a los polimorfismos RS42 y RS15. Sin embargo, estos últimos presentan un $D'=0,34$, lo que indica que no están ligados entre ellos y que se encuentran separados. El resto de los valores se encontraron muy por debajo de lo aceptable ($D' < 0,5$) (Reich y col, 2001), lo que sugiere que no existe asociación.

3. Haplotipos

La Tabla 8 nos indica los valores entregados por SHEsis para la construcción de haplotipos. Se observó solo un haplotipo con asociación a DM1. El haplotipo CGGA presentó un Odds Ratio (O.R.)=1,41 con un rango de [1,02-1,95] para un 95% de Intervalo de Confianza (IC). Este haplotipo presenta una frecuencia de 0,32 en pacientes en comparación con un 0,25 para controles. Esto es, que los portadores del haplotipo CGGA tiene un factor de riesgo a DM1 1,41 veces mayor que las personas que no lo poseen.

Tabla 8. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos RS42, RS37, RS15 y RS89 para pacientes y controles.

HAPLOTIPOS (RS42-RS37-RS15-RS89)	F pacientes	F controles	Odds Ratio [95%IC]
C G C A	0,03	0,05	0,58 [0,28-1,23]
C G C G	0,13	0,14	1,00 [0,66-1,53]
C G G A	0,32	0,25	1,41 [1,02-1,95]
C G G G	0,12	0,11	1,09 [0,69-1,72]
T A C A	0,07	0,09	0,75 [0,44-1,27]
T A C G	0,16	0,19	0,82 [0,56-1,20]
T G G A	0,04	0,06	0,68 [0,35-1,31]
T G G G	0,06	0,05	1,27 [0,68-2,36]

F<0,03 son ignoradas por el programa. RS96 y RS03 no fueron considerados en este análisis.

Al observar que el RS89 de *PD-L2* presenta las mismas frecuencias en casos y controles, se realizó un segundo análisis de haplotipos. Esta construcción (Tabla 9) se realizó solo con los polimorfismos de *PD-L1*. Este análisis arrojó solo un haplotipo con asociación a DM1, el cual presenta la misma combinación que en el análisis

anterior. Sin embargo presentó frecuencias más altas en pacientes y controles, y un O.R. mayor que el anterior.

Tabla 9. Frecuencias haplotípicas de los polimorfismos RS42, RS37 y RS15 para pacientes y controles.

HAPLOTIPOS (RS42-RS37-RS15)	F pacientes	F controles	Odds Ratio [95%IC]
C A C	0,03	0,04	0,81 [0,37-1,75]
C G C	0,17	0,19	0,90 [0,62-1,31]
C G G	0,44	0,36	1,44 [1,08-1,93]
T A C	0,22	0,28	0,72 [0,52-1,00]
T G G	0,11	0,12	0,97 [0,62-1,51]

F<0,03 son ignoradas por el programa.

4. Genotipos

Se realizó un análisis posterior con genotipos combinados de los polimorfismos en estudio, para determinar si existen genotipos asociados a riesgo o protección a DM1. Los datos obtenidos para el primer análisis se encuentran en la Tabla 10. Solo se consideraron los genotipos más frecuentes (mayores a 3%). Fueron detectadas tres combinaciones genotípicas asociadas a riesgo de padecer DM1 y dos combinaciones asociadas a protección. Las combinaciones asociadas a riesgo presentan O.R. de entre 13,5 (combinación 3) hasta 31,57 (combinación 5), todos con frecuencias mayores en pacientes. Por otro lado, las combinaciones genotípicas asociadas a protección presentan un O.R. de 0,05 (combinación 4) y 0,18 (combinación 2) con frecuencias más altas en los casos.

Tabla 10. Distribución de los genotipos múltiples más frecuentes en pacientes y controles.

Combinación Genotípica *	Pacientes		Controles		Odds Ratio	95% IC
	N	F (%)	N	F (%)		
CC-AG-CG-AG	8	4,02	5	2,56	1,33	[0,26 – 6,81]
CC-AG-CG-GG	6	3,02	5	2,56	1,20	[0,25 – 5,85]
CC-GG-CG-AG	7	3,52	7	3,59	0,80	[0,15 – 4,30]
CC-GG-GG-AG	8	4,02	4	2,05	0,22	[0,02 – 2,46]
CC-GG-GG-GG (1)	9	4,52	1	0,51	15,00	[1,21 – 185,3]
CT-AG-CG-AG (2)	6	3,02	14	7,18	0,18	[0,03 – 0,96]
CT-AG-GG-AG (3)	9	4,52	4	2,05	13,50	[1,20 – 152,3]
CT-AG-CC-AG (4)	0	0,00	8	4,10	0,05	[0,00 – 0,95]
CT-GG-CG-AG	10	5,03	8	4,10	0,79	[0,21 – 3,00]
CT-GG-GG-AG	11	5,53	7	3,59	0,58	[0,12 – 3,01]
CT-GG-CC-AA (5)	8	4,02	3	1,54	31,57	[1,37 – 725,8]

*Combinación Genotípica sigue el siguiente orden: RS42-RS37-RS15-RS89.

Aunque se obtuvieron resultados significativos en el análisis anterior, se realizó un segundo análisis. Esto es debido a que las combinaciones genotípicas construidas con los cuatro polimorfismos presentan frecuencias pequeñas por lo que poseen un bajo poder estadístico. Para este nuevo análisis se dejó fuera el RS89, y se construyó una nueva combinación solo con los polimorfismos de PD-L1 (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución de los genotipos múltiples más frecuentes en pacientes y controles para la combinación genotípica de RS42-RS37-RS15.

Combinación Genotípica	Pacientes		Controles		Odds Ratio	95% IC
	N	F (%)	N	F (%)		
CT-AG-CC	5	2,51	11	5,64	0,41	[0,10 – 1,61]
CC-GG-CC	11	5,53	10	5,13	1,10	[0,33 – 3,64]
CT-AG-GG	11	5,53	11	5,64	1,07	[0,35 – 3,25]
CC-GG-CG	14	7,04	15	7,69	1,13	[0,41 – 3,13]
CT-GG-CG	14	7,04	17	8,72	0,71	[0,25 – 1,99]
CC-AG-CG	15	7,54	13	6,67	1,44	[0,53 – 3,89]
CT-AG-CG	16	8,04	20	10,26	0,45	[0,16 – 1,28]
CT-GG-CC	16	8,04	9	4,62	1,36	[0,46 – 4,04]
CT-GG-GG	17	8,54	13	6,67	0,58	[0,19 – 1,75]
CC-GG-GG	18	9,05	8	4,10	9,00	[1,55 – 52,29]
TT-AG-CC	2	1,01	8	4,10	0,55	[0,08 – 3,60]

A partir de este análisis se obtuvo solo una combinación genotípica con asociación a DM1. Se determinó un O.R.= 9,00 para la combinación CC-GG-GG; con una frecuencia de 9,05 para pacientes en comparación con una frecuencia de 4,10 en los controles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas asociadas a combinaciones genotípicas de protección a DM1.

Finalmente se realizó un último análisis de genotipos combinados. Se construyó una combinación genotípica simple de los polimorfismos RS37 y RS15, los cuales presentaron las únicas diferencias estadísticamente significativas en las distribuciones alélicas durante este estudio (Tabla 12). De acuerdo a los resultados, se observó que las combinaciones GG-GG y AG-CC presentan diferencias estadísticamente significativas. La combinación GG-GG presenta una frecuencia de 19,6 en diabéticos versus una frecuencia de 12,82 en controles con un O.R.= 3,12 asociado a riesgo de DM1. Por otro lado, la combinación AG-CC presenta frecuencias de 6,53 en pacientes y 13,33 en controles, con un O.R.= 0,36 asociado con protección a DM1.

Tabla 12. Distribución de los genotipos simples más frecuentes en pacientes y controles para la combinación genotípica de RS37-RS15.

Combinación Genotípica	Pacientes		Controles		Odds Ratio	95% IC
	N	F (%)	N	F (%)		
AA-CG	6	3,02	10	5,13	0,48	[0,12 – 1,90]
AA-GG	10	5,03	8	4,10	1,46	[0,52 – 4,12]
AG-CG	35	17,59	41	21,03	0,63	[0,29 – 1,37]
AG-GG	23	11,56	17	8,72	1,47	[0,67 – 3,21]
GG-CG	34	17,09	37	18,97	0,59	[0,30 – 1,17]
GG-GG	39	19,60	25	12,82	3,12	[1,36 – 7,19]
AG-CC	13	6,53	26	13,33	0,36	[0,16 – 0,85]
GG-CC	33	16,58	24	12,31	2,29	[0,73 – 7,17]

5. Concentraciones Séricas de PD-L1 y PD-L2

Los datos obtenidos de la cuantificación realizada mediante ELISA para PD-L1 y PD-L2 se encuentran en la Tabla 13. En este caso, los datos obtenidos de controles pertenecen a personas sanas, mayores de 25 años y sin antecedentes de enfermedades autoinmunes. Los datos entregados para la población diabética y controles no presentan distribución normal en ninguno de los ligandos (datos no mostrados).

Tabla 13. Datos serológicos de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en pacientes con DM1 y controles.

LIGANDOS	PD-L1 (ng/mL)		PD-L2 (ng/mL)	
	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles
Mediana	1,42	3,35	0,95	2,88
Rango	0,23 - 7,45	0,49 - 5,89	0,16 - 3,77	0,24 - 5,01
N	198	189	175	120

Se puede observar que existe una disminución de la concentración de ambos ligandos en los pacientes al compararlos con los controles (Tabla 13 y Figura 6). Esta diferencia es estadísticamente significativa. Al mismo tiempo, se puede observar que en ambas poblaciones es menor la concentración de PD-L2 en comparación con PD-L1.

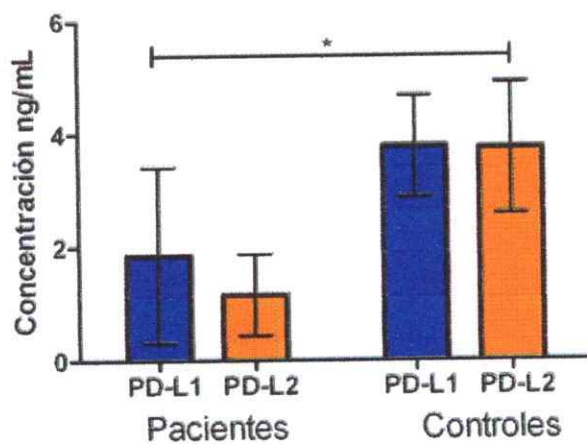


Figura 6. Concentración sérica de los ligandos PD-L1 y PD-L2 en pacientes y controles. Se muestra el promedio y la desviación estándar para cada ligando en pacientes y controles. Para determinar si existen diferencias significativas entre casos y controles se utilizó el test estadístico t de Student para muestras no pareadas. * $p < 0,05$.

Al comparar los niveles de cada ligando por paciente, se observa que el ligando PD-L2 se encuentra disminuido en relación al ligando PD-L1. Las diferencias son estadísticamente significativas (Figura 7).

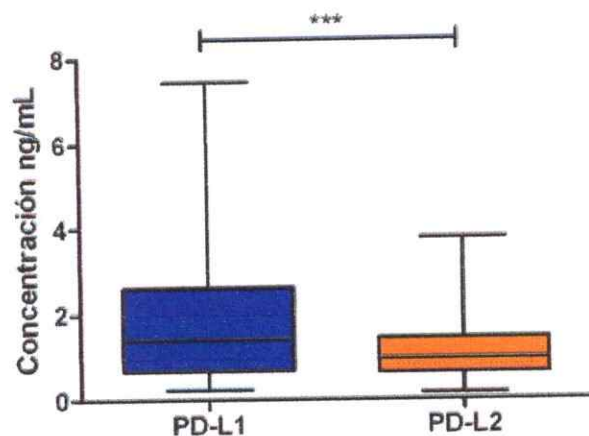


Figura 7. Datos serológicos de los ligandos en pacientes con DM1. Los datos indican que hay una disminución estadísticamente significativa de PD-L2 en comparación con PD-L1. La línea horizontal indica el valor de la mediana para cada ligando. Test estadístico utilizado: Wilcoxon para muestras pareadas. *** $p < 0,0001$.

6. Concentraciones Séricas de Autoanticuerpos

La cuantificación de la presencia de anticuerpos específicos contra elementos del páncreas, en este caso los anticuerpos GAD65 e IA2, se presentan en la Tabla 14. Los datos corresponden a la positividad de estos autoanticuerpos, de acuerdo a los valores de referencia descritos anteriormente en Materiales y Métodos. Los resultados correspondientes a controles no se muestran en la tabla, debido a que fueron negativos para ambos autoanticuerpos en toda la población control de análisis.

Tabla 14. Distribución de la presencia de autoanticuerpos en pacientes con DM1.

Anticuerpo Positivo	N	%
anti-GAD65	138	70,77
anti-IA2	105	53,85
anti-GAD65 + anti-IA2	80	41,03

A partir de estos resultados, se puede observar claramente que los pacientes presentan mayor frecuencia para anti-GAD65 en comparación con anti-IA2. Los pacientes que presentaron ambos autoanticuerpos representan el 41,03% del total.

7. Genotipos y Ligandos

Se agruparon los datos de las concentraciones de los ligandos de acuerdo a los genotipos de cada polimorfismo (Tabla 15). Aparentemente no se muestra una tendencia en la concentración de ligandos de acuerdo a la distribución de los genotipos.

Tabla 15. Datos de distribución porcentual por genotipos y concentraciones séricas de PD-L1 y PD-L2.

Polimorfismo	Genotipo	PD-L1 (ng/mL)		PD-L2 (ng/mL)	
		%	Mediana [Rango]	%	Mediana [Rango]
RS42	CC	44,7	1,43 [0,23 - 5,67]	44,4	0,88 [0,16 - 2,67]
	CT	43,7	1,05 [0,33 - 4,89]	42,2	0,75 [0,22 - 3,33]
	TT	11,6	1,46 [0,57 - 7,34]	13,3	1,21 [0,45 - 3,77]
RS37	AA	7,7	1,42 [0,62 - 4,33]	8,8	1,00 [0,45 - 3,77]
	AG	33,6	1,23 [0,38 - 4,89]	30,8	0,74 [0,27 - 2,45]
	GG	58,7	1,41 [0,23 - 7,34]	60,4	0,99 [0,16 - 3,33]
RS15	CC	22,3	1,44 [0,38 - 4,33]	23,3	0,76 [0,16 - 3,77]
	CG	36,9	1,01 [0,23 - 5,67]	35,6	0,94 [0,22 - 3,33]
	GG	40,8	1,45 [0,29 - 7,34]	41,1	0,88 [0,26 - 2,89]
RS89	AA	28,1	1,55 [0,23 - 7,34]	25,0	1,04 [0,34 - 2,89]
	AG	50,0	1,43 [0,38 - 5,67]	52,4	0,79 [0,0 - 3,77]
	GG	21,9	1,25 [0,57 - 4,62]	22,6	0,88 [0,27 - 2,67]

Para conocer si existe significancia en estos valores, se realizó un análisis de las concentraciones entre genotipos de cada polimorfismo. Como resultado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de concentración, tanto en PD-L1 como en PD-L2 (Figura 8).

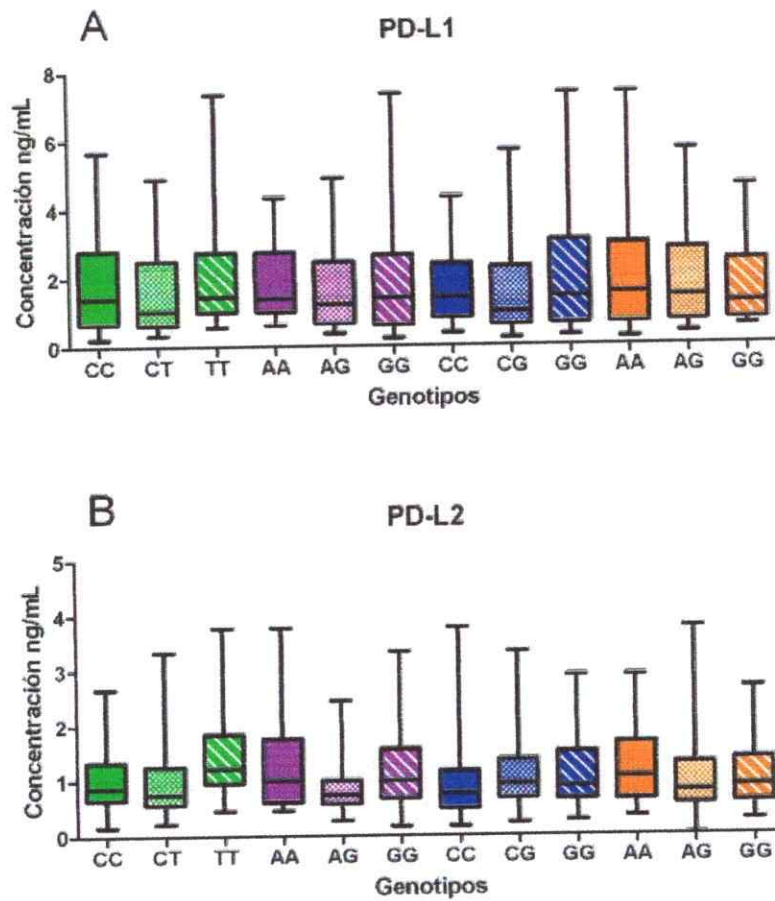


Figura 8. Concentraciones de PD-L1 y PD-L2 de acuerdo a los genotipos analizados en este estudio. Se muestra la mediana y el rango de las concentraciones de PD-L1 (A) y PD-L2 (B) para cada genotipo analizado. Las barras de diferentes tonos se corresponden con un polimorfismo de la siguiente manera: verde (RS42), lila (RS37), azul (RS15) y naranja (RS89). Test estadístico: Kruskal-Wallis con Dunns post test.

8. Genotipos y Autoanticuerpos

Para determinar la posible asociación entre genotipos de riesgo y/o protección con los marcadores de autoinmunidad clásicos de la DM1, se realizó un análisis

comparativo entre cada genotipo obtenido y la presencia de anti-GAD65 y anti-IA2. Solo se realizó este análisis con el grupo de pacientes DM1, debido a que en el grupo control no se encontró presencia de autoanticuerpos. Los datos obtenidos se presentan en la Figura 9, en donde se puede observar que la mayoría de los genotipos analizados sigue la tendencia general de distribución de autoanticuerpos positivos. Esto es, que hay un mayor porcentaje de pacientes que presenta el anticuerpo anti-GAD65, seguido por un porcentaje de anti-IA2 y finalmente con menor frecuencia para ambos anticuerpos. Sin embargo el genotipo CC del RS15 escapa a esta tendencia, puesto que presentó un mayor porcentaje de anti-IA2. Para analizar la significancia de estos datos se realizó el test de χ^2 . Como resultado, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los genotipos CC y CG del RS15.

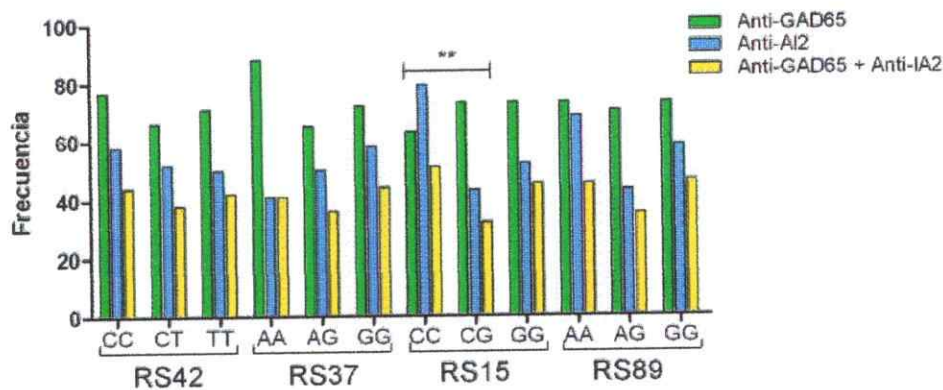


Figura 9. Distribución de autoanticuerpos por genotipo. Se presentan las frecuencias de autoanticuerpos positivos para anti-GAD65, anti-IA2 y para ambos (anti-GAD65 + anti-IA2). ** $p < 0,01$

DISCUSIÓN

La compleja etiología de la DM1 hace necesario que se identifiquen el mayor número de factores que intervienen en el momento del diagnóstico y durante el desarrollo de la enfermedad, con miras a las medidas de prevención de estos dos fenómenos. La determinación de estos factores varía de acuerdo a la población de análisis, tomando en cuenta especialmente la base genética de cada población y etnia a estudiar. Este estudio basado en polimorfismos de los ligandos PD-1 constituye la primera aproximación genética realizada en Latinoamérica.

La carga genética, asociada al factor autoinmune de la enfermedad, ya ha sido objeto de estudio en nuestra población. Genes como *CTLA-4* y *PD-1*, se han relacionado con la autoinmunidad, específicamente con alteraciones en la apoptosis, que derivan en una resistencia por parte de los LT a la muerte celular programada y que los transforma en LT autorreactivos, rompiendo la tolerancia autogénica. Estos luego son capaces de atacar células propias y, en el caso de DM1, de agredir a las células β del páncreas. Además, un reciente estudio realizado en pacientes chilenos con DM1 que analizó perfiles de expresión de genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos (Valencia y col, 2012), reveló resultados muy interesantes que darían cuenta de los eventos relacionados con la reactividad de los LT. En el estudio realizado por Valencia y col (2012), se reportó una expresión elevada del gen que codifica la proteína anti-apoptótica XIAP y niveles disminuidos del gen que codifica la proteína pro-apoptótica FAS en CMP, sometidas a concentraciones elevadas de glucosa, lo que podría relacionarse en forma indirecta con los fenómenos de mayor reactividad de los LT, fenómeno que ha sido observado en otras patologías (Vendrame y col, 2006).

Polimorfismos de los genes ligandos PD-L1 y PD-L2

Estudios de polimorfismos en PD-1 ya han sido llevados a cabo en diferentes poblaciones, incluyendo nuestro país. No obstante, datos que relacionan sus ligandos con el desarrollo de DM1 no se habían obtenido hasta ahora.

La asociación de los polimorfismos de los ligandos de PD-1 con enfermedades autoinmunes ya ha sido evaluada anteriormente en otros países. En el caso particular de este estudio, la elección de los polimorfismos se basó en datos obtenidos en distintas poblaciones, como los estudios realizados en población japonesa y taiwanesa (Ni y col, 2007; Wang y col, 2007a). Los polimorfismos escogidos correspondieron a aquellos cuyos resultados mostraron altas frecuencias, teniendo o no relación con DM1. Por lo tanto, se tomó la decisión de no considerar polimorfismos con frecuencias marginales.

La mayor parte de los polimorfismos escogidos y señalados en la literatura corresponden a SNPs que se encuentran en zonas intrónicas del gen. Posiblemente, este hecho no genera efectos sobre el transcrito de la proteína, como lo que podría ocurrir si los SNPs se encontraran en regiones traducibles, debido a que estos podrían generar cambios en el marco de lectura de la proteína. Además, en estudios previos realizados con SNPs de exones e intrones, se observó que existe mayor variabilidad alélica en regiones intrónicas en comparación con exones (Tsunoda y col, 2004). Por otro lado, se ha reportado que SNPs en regiones intrónicas (o SNPs silentes, como también se los ha definido) pueden afectar procesos de *splicing*, siendo a menudo la causa de distintas enfermedades (Pagani & Baralle, 2004). En algunos casos se ha descrito que estas mutaciones pueden crear nuevos sitios de *splicing*, generando así nuevos exones (o exón críptico) (Christie y col, 2001). Mutaciones sitio dirigidas a

un solo punto del genoma, dentro de regiones intrónicas, pueden generar este mismo efecto (Pagani y col, 2002). Otro efecto posible de SNPs silentes, es la inactivación o la creación de elementos *cis*- reguladores del *splicing* (Pagani & Baralle, 2004). Por lo tanto, los posibles efectos de estos polimorfismos en los ligandos de PD-1 podrían generar alteraciones en los niveles de ARNm o en la generación de ARNm aberrantes, afectando incluso el procesamiento y la traducción (Shen y col, 1999). Además, se ha descrito que un SNP intrónico en *PD-1* altera el sitio de unión del factor de transcripción (*RUNX1*) (Prokunina y col, 2002). De acuerdo a esto, se pueden producir proteínas carentes de dominios funcionales, afectando así, la unión de estos ligandos con PD-1 y su efecto sobre la vía de regulación negativa de las células T y, consecuentemente, gatillar el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Desequilibrio de Ligamiento

El Desequilibrio de Ligamiento (D') se relaciona con la frecuencia de recombinación entre alelos vecinos, lo que puede afectar la forma en que estos segregan en la descendencia (Reich y col, 2001). Los resultados de este análisis reflejan la forma en que se ubican en el cromosoma y facilitan la construcción de bloques de haplotipos, y que pueden estar asociados a distintas enfermedades. Según esto, de los cuatro SNPs sometidos a este análisis, tres cumplen con altos valores de ligamiento. Esto es, que los SNPs rs822342, rs2297137 y rs4143815 segregan juntos y están ubicados en forma contigua en el cromosoma. Esto además concuerda con que estos SNPs pertenecen al mismo gen (*PD-L1*), dejando afuera del bloque al rs16923189, perteneciente a *PD-L2*.

Distribución Alélica, Genotipos y Haplotipos

En este trabajo solo se encontraron dos polimorfismos con diferencias estadísticamente significativas en sus distribuciones alélicas. Ambos SNPs son pertenecientes al ligando *PD-L1*, donde se pudo observar una mayor frecuencia del alelo G en el rs2297137 para ambas poblaciones, pero con mayor frecuencia en pacientes con DM1 en comparación con controles. Sin embargo, el aumento en la frecuencia del alelo A en los controles podría asociarse con un posible efecto de protección contra el desarrollo de DM1, indicado por el valor de O.R.= 0,72. En el caso del rs4143815, se observó una marcada tendencia del alelo G en pacientes frente a controles. Sin embargo, la distribución de este polimorfismo en la población diabética no está en equilibrio Hardy-Weimberg, ya que la proporción genotípica tiene una marcada tendencia a la homocigocidad (GG) y al genotipo CG. Uno de los eventos que afectan el equilibrio H-W es la mutación, por lo que, en este caso, el SNP es el responsable que el alelo G afecte este equilibrio en la población diabética. Sin embargo, de acuerdo al O.R.= 0,72 existiría protección a DM1 dado por el alelo C, ya que en controles presenta un aumento en relación a pacientes. Por otro lado, el rs822342 que no presentó diferencias estadísticamente significativas en su distribución, mostró un aumento del alelo C en los casos y un aumento del alelo T en controles. Estos datos sólo concuerdan con lo encontrado en controles de Japón (C = 0,55 y T = 0,44), ya que en pacientes con DM1 en ese país, se observó la misma frecuencia para C y T (0,5) (Ni y col, 2007).

En relación con los polimorfismos del ligando *PD-L2*, solo uno de los tres SNPs analizados presentó variación genotípica, mientras que los otros dos presentaron solo un genotipo. Estos resultados difieren considerablemente con los datos publicados

con anterioridad. En el caso del rs7852996, este polimorfismo presentó solo el genotipo AT, y para el rs7854303, presentó sólo el genotipo CC. Este hallazgo evidencia la variabilidad del genoma a través de las poblaciones, dado que estos mismos polimorfismos presentaron tendencias muy distintas en población japonesa (rs7852996 alelo A caso/control = 0,89/0,84)(Ni y col, 2007) y en población taiwanesa (rs7854303 alelo C caso/control = 0,86/0,79)(Wang y col, 2007a). Sin embargo, el único alelo que presentó variación alélica, el rs16923189, no mostró diferencias en las frecuencias entre casos y controles. Por lo tanto, los polimorfismos de PD-L2 escogidos no dieron resultados para el análisis de asociación a DM1.

En relación a la construcción de genotipos múltiples y su posible asociación con riesgo o protección a DM1, al considerar todos los polimorfismos se pudieron detectar tres combinaciones genotípicas asociadas a un mayor riesgo y dos combinaciones asociadas con protección. Sin embargo, estas combinaciones presentaron frecuencias muy bajas tanto en casos y controles (menores a 0,06 y 0,08, respectivamente). Estos resultados no fueron considerados por su bajo poder estadístico. No obstante, al excluir el polimorfismo de *PD-L2* en un nuevo análisis estas frecuencias fueron mayores en ambas poblaciones. De acuerdo a esta segunda combinación, solo se encontró una combinación asociada a riesgo para el desarrollo de DM1 (CC-GG-GG). A pesar de lo anterior, para poder obtener frecuencias altas en pacientes y controles, se optó por considerar los polimorfismos que obtuvieron diferencias significativas en los análisis anteriores, los SNPs rs2297137 y rs4143815 de *PD-L1*. En este caso, las frecuencias aumentaron notablemente tanto en pacientes como en controles, alcanzando valores de hasta 0,2, y fue posible obtener combinaciones relevantes para este estudio. La combinación GG-GG, con frecuencias

de 0,20 en pacientes y 0,13 en controles, se asoció a riesgo de padecer DM1 (O.R.= 3,12). Por otro lado, la combinación AG-CC, con frecuencias de 0,06 en pacientes y 0,13 en controles, se encontró que se asocia a protección contra DM1. Estos resultados son interesantes en este estudio, ya que estas combinaciones se podrían evaluar a futuro como posibles marcadores genéticos de susceptibilidad en DM1 en población chilena.

En relación a los haplotipos encontrados, el primer análisis arroja un haplotipo asociado a riesgo de DM1 con un O.R.= 1,41, pero al igual que en el análisis por genotipos combinados, al eliminar el polimorfismo de *PD-L2* este valor aumentó a 1,44 para el haplotipo C-G-G, en donde igualmente aumentaron las frecuencias en pacientes y controles. Este hallazgo también estaría indicando la posibilidad de utilizar estos análisis como posibles marcadores dentro de la población.

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, la contribución de los polimorfismos de *PD-L1* (rs2297137 y rs4143815) serían los que otorgan una mejor aproximación al riesgo y/o protección de DM1.

Niveles Séricos de Ligandos

En relación a los niveles séricos de los ligandos, se encontró una baja concentración de ambos ligandos en los pacientes en comparación con los controles. Este resultado, da los primeros indicios de que la expresión de estas proteínas está alterada en los pacientes con DM1. Esta disminución provocaría la existencia de una menor disponibilidad de ligando para la molécula PD-1, generando que también disminuyan las señales generadas por esta proteína, como la disminución en la inhibición de la activación celular. Finalmente, esto podría tener una directa relación con la

disminución de la apoptosis, provocando una mayor reactividad de las células T en diabéticos.

Actualmente no se han publicado trabajos relacionados con las concentraciones séricas de estos ligandos en la DM1, por lo que estos hallazgos son altamente relevantes en el área de las enfermedades autoinmunes. Los valores encontrados en controles siguen la misma tendencia de valores recientemente encontrados en otras poblaciones de América (Argentina y Colombia, datos aún no publicados). Sin embargo, se debe señalar que los análisis realizados en PD-L2 aun no están validados y se encuentran en proceso de interpretación, debido a la escasa disponibilidad de kits comerciales para realizar la comparación y a la dificultad de detección en suero de este ligando, por lo que los resultados para PD-L2 deben ser interpretados con cautela.

De acuerdo a lo anterior, se podría ampliar el análisis de estos ligandos a otras enfermedades autoinmunes, ya que posiblemente marcaría la diferencia en cuanto a establecer si los valores obtenidos corresponden al perfil de una persona con DM1, o de las enfermedades autoinmunes en general.

Al comparar ambos ligandos entre sí, se pudo notar una baja en los niveles de PD-L2 en comparación con los niveles de PD-L1, tanto en pacientes como en controles. Junto a los problemas técnicos de detección de PD-L2 mencionados anteriormente, este fenómeno puede ser explicado también debido al patrón de expresión que presentan, como se ha mostrado en trabajos previos con distintos tipos celulares (Keir y col, 2008). Estudios anteriores han observado que la expresión de PD-L1 presenta niveles más altos que PD-L2 y presenta un rango mucho más amplio y variado de expresión en células y tejidos (Keir y col, 2008). Esto también concuerda con lo

anteriormente revisado en la literatura, señalando que PD-L2 presenta expresiones más limitadas en comparación con PD-L1, siendo lo que posiblemente se esté observando en esta disminución de los niveles séricos.

Cuando se relacionaron los niveles séricos de los ligandos con los genotipos, no se pudo observar ninguna asociación preferencial, ya que los valores de ambos ligandos presentaron una amplia desviación en los grupos experimentales y no se encontró tendencia alguna.

Marcadores de Autoinmunidad

Al realizar el análisis serológico para los auto-anticuerpos GAD65 e IA-2, se observó una alta frecuencia para GAD65 e IA-2 (70% y 54%, respectivamente) en pacientes. Este resultado es esperable de acuerdo a lo reportado en la literatura, donde la presencia de los dos autoanticuerpos positivos, se observa en aproximadamente un 75% de los pacientes con DM1, mientras que la presencia de alguno de estos anticuerpos por si solo imprime un riesgo asociado al 25% (Verge y col, 1996). Es importante destacar que estas altas frecuencias sólo se presentan para las muestras de pacientes con DM1, ya que se mostró nula presencia en los controles analizados.

Cuando se compararon las frecuencias de autoanticuerpos con los genotipos de cada polimorfismo PD-L1 y PD-L2 analizado, se observó que la mayoría presentó la misma tendencia, una mayor frecuencia de GAD65 que de IA-2. Sin embargo, se pudo observar solo un genotipo (CC del SNP rs4143815) que escapó a esta tendencia, el que presentó mayor frecuencia de IA-2. A pesar de esto, no se observó ninguna asociación mayor entre este genotipo y la producción de autoanticuerpos.

Proyecciones

Este trabajo se enmarca dentro de la actual línea de investigación relacionada con la búsqueda de marcadores genéticos de enfermedades autoinmunes, específicamente en DM1. De acuerdo a los resultados obtenidos, el haplotipo generado a partir de los polimorfismos de PD-L1 es un buen candidato para constituir un marcador genético de DM1 y ser utilizado como herramienta de análisis de susceptibilidad para la enfermedad. Las características de la DM1 hacen necesaria la utilización de técnicas predictivas de la enfermedad, ya que actualmente los únicos análisis se realizan una vez gatillados los síntomas y dan cuenta del estado de avance de la DM1.

CONCLUSIONES

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas para los polimorfismos de *PD-L1* y *PD-L2*, concluyendo lo siguiente:

- Para *PD-L1*, dos de los tres polimorfismos estudiados presentaron diferencias significativas en su distribución alélica (rs2297137 $p=0,035$ y rs4143815 $p=0,022$)
- Para *PD-L2*, solo uno de los tres polimorfismos analizados presentó variación genotípica, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en su distribución.
- El haplotipo C G G se asoció a riesgo de DM1 (O.R. = 1,44), con una frecuencia mayor en pacientes (0,44) en comparación con controles (0,36).
- Los análisis genotípicos de los rs2297137 y rs4143815, revelaron una combinación asociada a riesgo (GG-GG) y otra asociada a protección a DM1 (AG-CC).
- No se encontró relación entre genotipos y concentraciones séricas de los ligandos.
- No se encontraron diferencias relacionadas a genotipos de riesgo a DM1 con marcadores de autoinmunidad.

Por lo tanto, no existe asociación entre los polimorfismos de *PDL1* y *PDL2* y los niveles séricos de estas proteínas con mayor susceptibilidad a DM1 en población chilena, de acuerdo a la hipótesis planteada. Sin embargo, se hallaron resultados importantes en relación a genotipos y haplotipos de riesgo a DM1 en población chilena.

BIBLIOGRAFÍA

- Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, Smith RN, Yagita H, Akiba H. 2003. The programmed death-1 (PD-1) path way regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 198(1):63-69.
- Arends M, A. W. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32(223-254).
- Arnold R, Brenner D, Becker M, Frey C, P. K. 2006. How T lymphocytes switch between life and death. *Eur J Immunol* 36:1654-1658.
- Atkinson MA, Maclaren NK. 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 331(21):1428-36.
- Bach JF. 2005. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 25 Suppl:74-80.
- Bell GI, Horita S, JH. K. 1984. A polymorphic marker near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33:176-183.
- Bennett S, Lucassen A, Gough S, Powell E, D. U. 1995. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 9:284-292.
- Bennett ST, Wilson AJ, Cucca F, Nerup J, Pociot F, Mckinney PA, Barnett AH, S.C. B, Todd JA. 1996. IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insuline gene-linked minisatellite locus. *J Autoimmun* 9:415-421.
- Bottazzo GF. 1986. Death of a beta cell: homicide or suicide? *Diabet Med* 3:119-130.
- Cooke A. 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? *Immunology* 126(1):12-7.
- Chatenoud L, JA. B. 2007. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 7:622-632.
- Christie PT, Harding B, Nesbit MA, Whyte MP, Thakker RV. 2001. X-linked hypophosphatemia attributable to pseudoexons of the PHEX gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:3840-3844.
- Farid N, Sampson L, Noel P, Barnard J, Davis A, Hillman D. 1979. HLA-D-related (DRw) antigens in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 28:552-557.
- Flores S, Beems M, Oyarzún A, Carrasco E, Pérez-Bravo F. 2010. Programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphisms and type 1 diabetes in Chilean children. *Rev Med Chile* 138:543-550.
- Fourlanos S, Varney MD, Tait BD, Morahan G, Honeyman MC, Colman PG, Harrison LC. 2008. The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. *Diabetes Care* 31(8):1546-9.
- Freeman GJ. 2008. Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30):10275-6.
- García M, P. D. 2003. Clasificación, Diagnóstico y Pesquisa de la Diabetes Mellitus, Epidemiología de la Diabetes Mellitus, Etiopatogenia de la Diabetes Mellitus: Arancibia Hnos. y Cía. Ltda. 23-55 p.
- Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR. 2004. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of highrisk HLA haplotypes. *Lancet* 364:1699-1700.
- Hawa MI, Beyan H, Buckley LR, Leslie RD. 2002. Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes. *Am J Med Genet* 115(1):8-17.
- Hayashi M, Kouki T, Takasu N, Sunagawa S, I. K. 2008. Association of an A/C single nucleotide polymorphism in programmed cell death-ligand 1 gene with Graves' disease in japanese patients. *Eu J Endocrinol* 158:817-82.
- He XH, Xu LH, Y. L. 2005. Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking Igv-like domain. *Acta Pharmacol. Sin.* 26:462-468.
- Johansson M, Arlestig L, Moller B, S. R-D. 2005. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52:1665-1669.

- Karvonen M, Tuomilehto J, Libman I, LaPorte R. 1993. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia* 36(10):883-92.
- Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2008. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology* 26:677-704.
- King ML, Shaikh A, Bidwell D, Voller A, Banatvala JE. 1983. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type I) diabetes mellitus. *Lancet* 1(8339):1397-9.
- Kong EK, Prokunina-Olsson L, Wong WH, Lau CS, Chan TM, Alarcon-Riquelme M, YL L. 2005. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis Rheum* 52(1058-1062).
- Korsmeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN, Veis-Novack DJ, GP. L. 1995 Reactive oxygen species and the regulation of cell death by the Bcl-2 gene family. *Biochim Biophys Acta* 1271(1):63-66.
- Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Maurer M, H. W. 2005. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 58:50-57.
- Kukreja A, NK. M. 1999. Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4371-4378.
- Lafferty KJ, AJ. C. 1975. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 53:27-42.
- Li Z, Zhang Z, He Z, Tang W, Li T, Zeng Z, He L, Shi Y. 2009. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>). *Cell Res* 19(4):519-23.
- Lin SC, Yen JH, Tsai JJ, Tsai WC, Ou TT, Liu HW, CJ. C. 2004. Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:770-775.
- Lohmann T, Leslie RD, M. L. 1996. T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun* 9:385-389.
- Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, DJ. S. 2007. Largescale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet* 39(1074-1082).
- Magno G, I. J. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146(3-15).
- Marron MP, Zeidler A, RaVel LJ, Eckenrode SE, Yang JJ, Hopkins DI, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios M, Martinez Larrad MT and others. 2000. Genetic and physical mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM12) to a 100-kb phagemid artificial chromosome clone containing D2S72-CTLA4-D2S105 on chromosome 2q33. *Diabetes* 49:492-499.
- Matsuura N, Fukuda K, Okuno A, Harada S, Fukushima N, Koike A, Ito Y, T. H. 1998. Descriptive epidemiology of IDDM in Hokkaido, Japan: the childhood IDDM Hokkaido registry. *Diabetes Care* 21:1632-1636.
- Mitchell AL, Cordell HJ, Soemedi R, Owen K, Skinningsrud B, Wolff AB, Ericksen M, Undllien D, Husebye E, S. P. 2009. Programmed death ligand 1 (PD-L1) gene variants contribute to autoimmune Addison's disease and Graves' disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab* 94(12):5139-5145.
- Murphy FJ, Hayes I, TG. C. 2003. Targeting inflammatory diseases via apoptotic mechanisms. *Curr Opin Pharmacol* 3:412-419.
- Myers MA, Hettiarachchi KD, Ludeman JP, Wilson AJ, Wilson CR, Zimmet PZ. 2003. Dietary microbial toxins and type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 1005:418-22.
- Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, J L. 1974. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 2:864-866.
- Ni R, Ihara K, Miyako K, Kuromaru R, Inuo M, Kohno H, T. H. 2007. PD-1 gene haplotype is associated with the development of type 1 diabetes mellitus in Japanese children. *Human Genetics* 121:223-232.
- Nielsen C, Hansen D, Husby S, Jacobsen BB, ST. L. 2003. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 62:492-497.

- Nielsen C, Lastrup H, Voss A, Junker P, Husby S, ST. L. 2004. A putative regulatory polymorphism in PD-1 is associated with nephropathy in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 13:510-516.
- Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, Sato M, S. I. 1996. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4⁻CD8⁻) thymocytes. *Int. Immunol.* 8:773-780.
- Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, T. H. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11:141-151.
- Nishimura H, Okazaki T, Tanaka Y, et al. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291:319-322.
- Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, C. G. 1996. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Human Molecular Genetic* 5:1075-1080.
- Okazaki T, J. W. 2005. PD-1/PD-L pathways and autoimmunity. *Autoimmunity* 38:353-357.
- Ounissi-Benkhalha H, Polychronakos C. 2008. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends Mol Med* 14(6):268-75.
- Owerbach D, Lernmark A, Platz P, Ryder LP, Rask L, Peterson PA, J. L. 1983. HLA-D region beta-chain DNA endonuclease fragments differ between HLA-DR identical healthy and insulin-independent diabetic individuals. *Nature* 303:815-817.
- Pagani F, Baralle FE. 2004. Genomic variants in exons and introns: identifying the splicing spoilers. *Nat Rev Genet* 5(5):389-96.
- Pagani F, Buratti E, Stuani C, Bendix R, Dork T, Baralle FE. 2002. A new type of mutation causes a splicing defect in ATM. *Nat Genet* 30(4):426-9.
- Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, Brookes AJ, Tentler D, Kristjansdottir H, Grondal G and others. 2002. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 32:666-669.
- Prokunina L, Padyukov L, Bennet A, de Faire U, Wiman B, Prince J, Alfredsson L, Klareskog L, M. A-R. 2004. Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum* 50:1770-1773.
- Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R and others. 2001. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411(6834):199-204.
- Riboulet-Chavey A, Diraison F, Siew LK, Wong FS RG. 2008. Inhibition of AMP-activated protein kinase protects pancreatic beta-cells from cytokine-mediated apoptosis and CD8⁺ T-cell-induced cytotoxicity. *Diabetes* 57:415-423.
- Salama AD, Chitnis T, Imitola J, Ansari MJ, Akiba H, F. T. 2003. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) path way in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 191:71-78.
- Sanghera DK, Manzi S, Bontempo F, Nestlerode C, MI. K. 2004. Role of an intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies. *Hum Genet* 115:393-398.
- Santos JL, Pérez-Bravo F, Carrasco E. 2000. Association between HLA-DQB1*0201 and DQB1*0302 alleles with type 1 diabetes do not depend on cytomegalovirus antibody status al set: a case-parent study conducted in Chile. *Immunology and Cell Biology* 78:259-263.
- Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, C. H. 1989. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83(3):865-875.
- Shen LX, Basilion JP, Jr. SV. 1999. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:7871-7876.
- Silverstein J, Klingensmith G, Copeland K, Plotnick L, Kaufman F, Laffel L, Deeb L, Grey M, Anderson B, Holzmeister LA and others. 2005. Care of children and adolescents with type 1 diabetes: a statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 28(1):186-212.

- Singal D, Blajchman M. 1973. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* 22:429-432.
- Sprent J, H. K. 2002. The thymus and negative selection. *Immunology Reviews* 185:126-135.
- Thorsby E, Ronningen K. 1993. Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36:371-377.
- Tibbetts MD, Zheng L, MJ. L. 2003. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* 4:404-409.
- Todd JA, Bell JI, HO. M. 1987. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329:599-604.
- Trucco M, Dorman JS. 1989. Immunogenetics of insulin-dependent diabetes mellitus in humans. *Crit Rev Immunol* 9(3):201-45.
- Tsunoda T, Lathrop GM, Sekine A, Yamada R, Takahashi A, Ohnishi Y, Tanaka T, Nakamura Y. 2004. Variation of gene-based SNPs and linkage disequilibrium patterns in the human genome. *Human Molecular Genetics* 13:1623-1632.
- Tsutsumi Y, Jie X, Ihara K, Nomura A, Kanemitsu S, Takada H, T. H. 2006. Phenotypic and genetic analyses of T cell-mediated immunoregulation in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med* 23:1145-1150.
- Undlien DE, Friede T, Rammensee HG, Joner G, K. D-J. 1997. HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. *Diabetes* 46:143-149.
- van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91(1):79-118.
- Vargas-Rojas MILJ-Á, G. Ramírez , D. Torres-García, R. Barquera, A.A. Gastelum-Martínez y J. Zúñiga. 2008. PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune. *REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS Mexico* 21(4):272-279.
- Vehik K, Hamman RF, Lezotte D, Norris JM, Klingensmith GJ, Rewers M, Dabelea D. 2008. Trends in high-risk HLA susceptibility genes among Colorado youth with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 31(7):1392-6.
- Vendrame F, Segni M, Grassetti D, Tellone V, Augello G, Trischitta V, Torlontano M, Dotta F. 2006. Impaired caspase-3 expression by peripheral T cells in chronic autoimmune thyroiditis and in autoimmune polyendocrine syndrome-2. *J Clin Endocrinol Metab* 91(12):5064-8.
- Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, GS. E. 1996. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45(7):926-933.
- Wagenknecht LE, Roseman JM, Herman WH. 1991. Increased incidence of insulin-dependent diabetes mellitus following an epidemic of Coxsackievirus B5. *Am J Epidemiol* 133(10):1024-31.
- Wang J, Yoshida T, Nakaki F, Hiai H, Okazaki T, T. H. 2005. Establishment of NOD-Pdcd1 ^{-/-} mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11823-11828.
- Wang SC, Lin CH, Li RN, Ou TT, Wu CC, Tsai WC, Liu HW, JH. Y. 2007a. Polymorphisms of genes for programmed cell death 1 ligands in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 27:563-567.
- Wang SC, Lin CH, Ou TT, Wu CC, Tsai WC, Hu CJ, Liu HW, JH. Y. 2007b. Ligands for programmed cell death 1 gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Rheumatology* 34:721-725.
- Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, al. e. 2002. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J. Immunol.* 169:5538-5545.
- Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. 1979. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 300(21):1173-9.