

UCH-Fc
Biotecnología
B186
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

**POLIMORFISMOS +49A/G Y -318C/T DEL ANTÍGENO 4 ASOCIADO AL LINFOCITO T
CITOTÓXICO (CTLA-4) EN LA DIABETES TIPO 1 Y SU RELACION CON LAS
CITOQUINAS TGF- β , TNF- α , INF- γ e IL-1 β EN UN ESTUDIO DE ASOCIACION EN CASOS Y
CONTROLES DE LA REGION METROPOLITANA**

Memoria de Título

Entregada a la Universidad de Chile

para Optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por

Iván Andrés Balic Norambuena

**Noviembre, 2007
Santiago de Chile**



Director de Tesis: Dr. Francisco Pérez-Bravo



Memoria de Título entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

“POLIMORFISMOS +49A/G Y -318C/T DEL ANTÍGENO 4 ASOCIADO AL LINFOCITO T CITOTÓXICO (CTLA-4) EN LA DIABETES TIPO 1 Y SU RELACION CON CITOQUINAS TGF- β , TNF- α , INF- γ e IL-1 β EN UN ESTUDIO DE ASOCIACION EN CASOS Y CONTROLES DE LA REGION METROPOLITANA”

IVÁN ANDRÉS BALIC NORAMBUENA

Director de Memoria de Título

Dr. Francisco Pérez-Bravo

Firma manuscrita en azul de Francisco Pérez-Bravo, sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. María Rosa Bono Merino

Firma manuscrita en azul de María Rosa Bono Merino, sobre una línea horizontal.

Dr. Alejandro Roth Metcalfe

Firma manuscrita en azul de Alejandro Roth Metcalfe, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Noviembre 2007



BIOGRAFÍA



Cursé mi enseñanza básica y media en el Instituto Nacional, donde desarrollé mi temprano interés por las ciencias y me brindó las herramientas necesarias para poder rendir una buena PAA e ingresar a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile el año 2000. En esta casa de estudio me desarrollé como profesional y como persona de manera íntegra, licenciándome en Ingeniería en Biotecnología Molecular el año 2006 para optar al título profesional mediante el presente trabajo.



AGRADECIMIENTOS



A las primeras personas que quiero agradecer y a quienes dedico este trabajo, es a mi familia fundamentalmente por el constante apoyo y amor incondicional. Fueron testigos de mi evolución como persona y el motor de este esfuerzo por convertirme en profesional. Muchas gracias a ti Papá por el impulso y la motivación constante durante toda mi vida y por darme las herramientas para plantarme en este mundo y formar una hermosa familia, así como tú lo hiciste con nosotros.

A ti Mamá por completar el círculo de una formación íntegra, traspasándome toda tu experiencia y tu fantástica filosofía de "vivir sólo para ser feliz". Gracias a ti soy una mejor persona. Gracias también a mis hermanos: Rubén por ser un excelente ejemplo de sacrificio y Cristóbal por entregarnos tu amor y mantener el equilibrio en el hogar. Estoy muy orgulloso de ustedes dos, por lo que haz logrado hasta ahora Rubén y por lo que estoy seguro vas a lograr tu Pichi.

También quisiera agradecer a mis compañeros y amigos que han estado siempre conmigo en este desafío de ser profesionales. Especialmente al grupete de estudio Seba, Carola y Piantobal....gracias por el apoyo, el cariño, la preocupación, el empuje y sobretodo la gran amistad que nos une. También a mi amigo Felipe, que califica en la lista de Personas Notables que he conocido en mi vida, a la cual pertenecen también muchos otros: Negro, Tuti, Nacho, Ricardo, Pilar, Ferni, Mariela, Ororo....en fin, la lista es larga. Especialmente agradecer a mi amigo Pablo por tantos alegres momentos en cleta y carretaldos, en definitiva por esa amistad que se da con pocos y que sé perdurará en el tiempo.

Quisiera agradecer también a toda la gente que conocí en el Laboratorio de Epidemiología Nutricional y Genética del INTA, por el apoyo y la excelente acogida desde el primer día, especialmente a Maria Elena. También agradezco a quien fue mi tutor y maestro, el Dr. Francisco Pérez-Bravo por quien hoy siento una gran amistad, respeto y admiración. Muchas gracias por tu apoyo incondicional y tus constantes palabras de aliento que se tradujeron en un gratisimo ambiente de trabajo y en una motivación adicional por esforzarme al máximo.

Finalmente, quisiera agradecer de manera especial a la mujer que ha estado a mi lado apoyándome siempre la mayor parte de mi carrera y que sigue apoyándome y entregándome su infinito amor. Para ti también va dedicado este trabajo, Muñequita. Y agradezco también a su hermosa y numerosa familia, especialmente a la tía Nina y a mi amigo y cuñado Kike.

INDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XV



I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes Generales	1
1.2. Diabetes Mellitus Tipo 1	3
2. Epidemiología de la Diabetes Mellitus tipo 1	6
3. Factores Ambientales	10
4. Factores Genéticos	15
5. CTLA-4	19
6. Polimorfismos de CTLA-4	24
7. Antecedentes Serológicos de la Diabetes tipo 1	26
8. Hipótesis	28
9. Objetivos	



9.1. Objetivo General	28
9.2. Objetivos Específicos	29
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Participantes del Estudio	30
2. Diseño del Estudio	31
3. Extracción DNA	31
4. Genotipificación	33
5. Análisis Serológico	35
6. Análisis Estadístico	37
III. RESULTADOS	
1. Análisis Genético	38
2. Análisis Serológico	
2.1 Anticuerpos	43
2.2 Citoquinas	46
3. Análisis Clínico	50
IV. DISCUSIÓN	51
V. CONCLUSIÓN	61
VI. ANEXO	62
VII. REFERENCIAS	65

ÍNDICE DE TABLAS



Tabla 1.	Frecuencia alélica en el estudio caso-control para los polimorfismos +49A/G y -318C/T del gen de CTLA-4.	39
Tabla 2.	Frecuencias genotípicas entre casos y controles para los polimorfismos +49A/G y -318C/T del gen de CTLA-4.	40
Tabla 3.	Frecuencias haplotípicas relevantes entre casos y controles para los polimorfismos +49A/G y -318C/T del gen de CTLA-4.	41
Tabla 4.	Resultados TDT para cada polimorfismo en 90 tríos caso-padres.	42
Tabla 5.	Resultados TDT por genotipo para cada uno de los polimorfismos.	43
Tabla 6.	Presencia serológica de anticuerpos GAD65 e IA2 en el estudio caso-control.	44
Tabla 7.	Presencia de anticuerpos GAD65 e IA2 agrupados según los genotipos CTLA-4 más relevantes.	45
Tabla 8.	Presencia de anticuerpos GAD65 e IA2 agrupados según presencia de alelos de CTLA-4 en el grupo de casos diabéticos estudiados.	46
Tabla 9.	Cuantificación de las citoquinas TNF α , TGF β e INF γ en sueros de pacientes diabéticos y muestras controles.	47
Tabla 10.	Cuantificación de citoquinas TNF α , TGF β e INF γ en sueros de pacientes diabéticos según los genotipos CTLA-4 más relevantes.	48
Tabla 11.	Cuantificación de las citoquinas TGF β e INF γ en casos y controles agrupados según genotipo CTLA-4 más relevantes.	49
Tabla 12.	Datos clínicos de pacientes diabéticos agrupados según genotipos CTLA-4 relevantes.	51



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama donde están presentes los productos de los 4 genes principales de asociación a diabetes tipo 1 (Gillespie, 2006).	19
Figura 2.	Variantes encontradas de CTLA-4 producto de modificaciones post-transcripcionales (Teft, 2006).	21
Figura 3.	Polimorfismos encontrados en las proximidades del gen de CTLA-4 (Anjos, 2004).	25
Figura 4.	Mecanismos de destrucción de la célula β en la diabetes tipo 1. (Kawasaki, 2004).	28
Figura 5.	Fotografía de un gel de agarosa con productos de cortes de distintas muestras para ambos polimorfismos estudiados.	35
Figura A.	Valores de Odds Ratio (OR) de asociación del polimorfismo A+49G con diabetes tipo 1 de 29 estudios (Kavvoura, 2005).	63
Figura B.	La plasticidad en la señalización de CTLA-4 se correlaciona con su asociación a PP2A (Teft, 2006).	64
Figura C.	Valores de Odds Ratio (OR) de asociación del polimorfismo A+49G con la presencia de autoanticuerpos contra la descarboxilasa 65 del ácido glutámico (GAD65) en 6 estudios (Kavvoura, 2005).	65

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ABBOS	Péptido Inmunogénico derivado de BSA
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AIH	Hipotiroidismo Autoinmune
Ala	Alanina
AP-1	Factor de Transcripción AP-1
APC	Células Presentadoras de Antígeno
BABYDIAB	Estudio de Recién Nacidos Diabéticos
BB	Ratón Bio-Breeding
BbvI	Enzima de Restricción BbvI
BSA	Albumina Sérica Bovina
C	Citosina
CMV	Citomegalovirus
CTLA-4	Antígeno 4 Asociado al Linfocito T Citotóxico
DAISY	Estudio de Autoinmunidad Diabética en la Juventud
DBD	Dominio de Unión a DNA
DIPP	Estudio de Predicción y Prevención de la Diabetes
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Deoxi-Ribonucleótido Tri-Fosfato

ELISA	Inmuno-Ensayo Enzimático de Detección
Fyn	Proteína Tirosina Quinasa
G	Guanina
GAD	Descarboxilasa del Ácido Glutámico
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
IA2	Proteína Tirosina Fosfatasa 2
IAA	Anticuerpo Antinsulina
IC	Intervalo de Confianza
IDDM	Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente
IFN- γ	Interferon γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
INS	Insulina
KO	“Knock Out”
Lck	Proteína Tirosina Quinasa
LYP	Proteína Tirosina Fosfatasa
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MLS	“Maximum Lod Score”
MseI	Enzima de Restricción MseI
NFAT	Factor de Transcripción NFAT
NF-kB	Factor de Transcripción NF-kB
NK	Células Natural Killers
NOD	Ratón Diabético No Obeso

NS	No Significativo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	“Odds Ratio”
pb	Par de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PP2A	Serina/Treonina Fosfatasa PP2A
PTPN22	Proteína Tirosina Fosfatasa N22
RFLP	Polimorfismo del Largo de los Fragmentos de Restricción
RPM	Revoluciones Por Minuto
SD	Desviación Estándar
SNP	Polimorfismo De Un Solo Nucleótido
T	Timina
Tc	Linfocito T Citotóxico
TDT	Test de Desequilibrio de Transmisión
TGF- β 1	Factor de Crecimiento Tumoral β 1
Th	Linfocito T Cooperador (helper)
Thr	Treonina
TMB	Tetrametilbencidina
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
TNF- β	Factor de Necrosis Tumoral β
TRIGR	Estudio para Reducir la DM1 en Población de Riesgo
VNTR	Repetidos en Tandem de Número Variable
ZAP	Proteína Tirosina Quinasa

Unidades

mL	Mililitro
μ L	Microlitro
$^{\circ}$ C	Grados Celsius
U	Unidades de actividad
pb	Pares de bases
Kb	Kilobases
Kda	Kilodaltons
U/mL	Unidades por mililitro
ng/mL	Nanogramos por mililitro

RESUMEN

La investigación en el ámbito de la genética para entender la etiología de la diabetes tipo 1 ha señalado que el sistema HLA constituye la región más importante para explicar la incidencia de esta patología en el mundo. Sin embargo, este locus ha mostrado ser insuficiente y no permite explicar más allá del 50% de los casos. Por esta razón, se han analizado una serie de otros marcadores genéticos para esta enfermedad en regiones no HLA. Entre ellos se encuentra el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4), cuyo gen presenta una variedad de polimorfismos. El propósito de este trabajo, fue analizar la asociación de los polimorfismos A+49G y C-318T con la diabetes tipo 1 en población chilena mediante un estudio caso-control y un diseño intrafamiliar (estudio de tríos). Nuestros resultados mostraron que el polimorfismo A+49G estuvo más asociado a la diabetes tipo 1 que el polimorfismo C-318T, sin embargo no alcanzó un nivel de significancia estadística. El estudio de tríos, reveló a partir del test de desequilibrio de transmisión (TDT), la existencia de una tendencia de transmisión preferencial del alelo G (polimorfismo A+49G) desde los padres al caso afectado (56% de transmisión). Adicionalmente, se realizó un estudio serológico que evaluó las concentraciones de los anticuerpos GAD65 e IA-2 y de las citoquinas TGF- β , TNF- α , INF- γ e IL-1 β en los participantes del estudio caso-control. Nuestros resultados mostraron que la presencia del genotipo GG/CC se relacionó con un perfil más agresivo de la enfermedad dado por una mayor presencia del anticuerpo GAD65 y

de las citoquinas TNF- α e INF- γ , tendencia que también se vio confirmada con los datos clínicos del debut (glicemia y cetoacidosis).

Finalmente, concluimos que el polimorfismo +49A/G del gen de CTLA-4 se asoció a diabetes tipo 1 en población chilena principalmente a través del genotipo compuesto GG/CC, el cual se correlacionó claramente con un perfil inmunológico más agresivo de la enfermedad.

ABSTRACT

The research in the area of the genetics in order to understand the etiology of type 1 diabetes has indicated that the HLA system constitutes the most important genomic region associated to incident of this pathology in the world.

Nevertheless, this locus has proved to be insufficient and does not permit the explanation of over 50% of the cases. For this reason, a series of other non HLA genetic markers have been analyzed. Among at them, the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4), whose gene presents a variety of genetics polymorphisms.

The aim of this work was to analyze the association of the A+49G and C-318T polymorphisms with type 1 diabetes in Chilean population by means of case-control study and intrafamilial design (study of trios).

Our results show that the A+49G polymorphism has better association with type 1 diabetes when compared to C-318T variant, however, this association did not reach a level of statistical significance.

Study of trios using the transmission disequilibrium test (TDT), showed the existence of a preferential transmission trend of G allele (polymorphism A+49G) from the parents to the affected case (56% of transmission).

Additionally, a serologic study was carried out to evaluated the concentration of the antibodies GAD65 and IA-2 and TGF- β 1, TNF- α , INF- γ and IL-1 β cytokines among the participant of the case-control study.

Our result show that the GG/CC genotype is related to a more aggressive disease profile given by a major presence of the GAD65 antibody and TNF- α and INF- γ cytokines, trend observed with the clinical information of the debut (glycaemia and ketoacidosis).

Finally, we conclude that the A+49G polymorphism at the CTLA-4 gene is associated with type 1 diabetes in Chilean population mainly across the compound GG/CC genotype and is clearly related to a more aggressive immunological disease profile.

INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes Generales

La Diabetes Mellitus es la enfermedad metabólica más importante y frecuente que se conoce, constituyendo un serio problema de Salud Pública a nivel mundial y particularmente a nivel nacional debido a su aumento en forma progresiva a lo largo de nuestro país. Más que una enfermedad, constituye un verdadero síndrome como así lo define la Organización Mundial de la Salud (OMS), definición que sufre constantes modificaciones de acuerdo a la evolución del conocimiento que genera la investigación de la diabetes a nivel mundial. Actualmente, el término Diabetes Mellitus se refiere a un trastorno metabólico de etiología múltiple, caracterizado por hiperglicemia crónica debido a las alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, como consecuencia de defectos en la secreción de la insulina, acción de la hormona o de ambos (García, 2003).

La diabetes mellitus ha sido clasificada en cuatro grandes grupos: Diabetes Mellitus Tipo 1, Diabetes Mellitus tipo 2, Diabetes Gestacional y Otros Tipos Específicos de Diabetes (WHO, 1999). A esta última categoría pertenecen un gran número de patologías de muy diversa etiología, que tienen en común su evolución con hiperglicemia. La OMS ordenó este grupo con siete subcategorías que juntas

representan una bajísima incidencia, menor al 1% del total de los pacientes diabéticos. Entre estas categorías se agrupan defectos genéticos de la función de la célula beta y de la insulina, endocrinopatías, diabetes inducida por drogas, agentes químicos e infecciones, y síndromes genéticos ocasionalmente asociados a diabetes, como son el Síndrome de Down y el de Turner entre otros (WHO, 1999).

La Diabetes Gestacional fue definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se inicia o se diagnostica por primera vez durante el embarazo. Este tipo de diabetes se origina debido a los cambios hormonales típicos del embarazo que favorecen el desarrollo de diabetes entre un 1% y un 5% en las mujeres embarazadas. La Diabetes Gestacional puede desaparecer después del embarazo o permanecer posteriormente como Diabetes Mellitus Tipo 2, por lo que resulta imprescindible reevaluar a la paciente en el período de puerperio (WHO, 1999).

La Diabetes Mellitus Tipo 2 es la forma más frecuente de diabetes en el mundo, afectando a cerca del 90% de los pacientes diabéticos y superando el 95% en nuestro país (García, 2003). Los pacientes de este tipo de diabetes presentan dificultad para la acción de la insulina (insulino-resistencia) o bien un desbalance en los niveles de esta hormona que generan insuficiencia en su acción. Se asocia con frecuencia a obesidad, dislipidemia e hipertensión arterial. La etiología de este tipo de diabetes aún no se conoce con certeza, aunque se sabe que tiene una fuerte predisposición genética y que

se desarrolla por lo general después de los 30 años de edad. Sin embargo, en los últimos años se ha observado una verdadera epidemia emergente de diabetes tipo 2 en niños y adolescentes obesos, particularmente en edad puberal lo que ha generado fuerte discusión en el mundo científico respecto a los factores desencadenantes de esta patología (García, 2003).

1.2 Diabetes Mellitus Tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), también conocida como diabetes insulino-dependiente, constituye el trastorno endocrino-metabólico más frecuente en la infancia y adolescencia, caracterizándose por la incapacidad del páncreas de producir insulina, lo que confiere a esta enfermedad características únicas entre las patologías crónicas. Su tratamiento es un trabajo de 24 horas al día, que consiste en tratar de mantener la glucosa en la sangre tan cercana a niveles normales como sea posible mediante inyecciones de insulina. Esto implica un constante monitoreo de la glicemia y un profundo aprendizaje de esta enfermedad por parte tanto del afectado como de su familia para tomar constantes decisiones en el tratamiento. Es por esta razón que este tipo de diabetes causa el mayor impacto en aspectos médicos, psicológicos, sociales y emocionales tanto para el paciente como para su familia, más que cualquier otro tipo de diabetes.

Su etiología es extremadamente compleja, interviniendo factores ambientales que interaccionan con componentes de predisposición genética que desembocan en un irreversible ataque de origen autoinmune contra las células productoras de insulina, llamadas células β , ubicadas en el islote pancreático (Foulis, 1991). Dentro de estos factores ambientales figuran infecciones virales, toxinas y dieta, entre otros, conduciendo de alguna manera aún desconocida a la ruptura de la tolerancia autogénica normal. Se cree que este proceso podría ser iniciado por la presentación de algún péptido diabetogénico o a través de un proceso de mimetismo molecular, teorías muy interesantes, pero que explican una pequeña cantidad de casos, dado que la mayoría de los casos de diabetes tipo 1 no presentan antecedentes de infecciones de ningún tipo al momento del diagnóstico (Pérez, 1996).

También existe gran controversia en el campo de los factores genéticos que podrían estar en juego, sin embargo existe un candidato que acapara estudios desde hace décadas debido al papel central que juega justamente en el proceso de tolerancia autogénica: la región del Antígeno del Leucocito Humano, más conocido como Sistema HLA. Se ha determinado que cerca de un 95% de las personas que padecen de diabetes tipo 1 presentan una alta frecuencia de los alelos DR3 o DR4, siendo particularmente sensibles aquellas que presentan ambos alelos (Devendra, 2003). También se ha observado en muchas etnias cierta tendencia a presentarse algunos polimorfismos particulares del alelo DQ en los afectados. Sin embargo, estas tendencias genéticas también se presentan en gran cantidad de la población no afectada, siendo insuficientes

en explicar completamente la etiología de esta enfermedad, lo que ha generado una intensa búsqueda de nuevos genes o regiones génicas candidatas.

2. Epidemiología de la Diabetes Mellitus Tipo 1

La epidemiología es la ciencia que se preocupa por estudiar la distribución y las causas que determinan la frecuencia de patologías que afectan al ser humano, por lo que la DM1 se convierte en una enfermedad “diseñada” para los epidemiólogos. Esto porque a nivel mundial existe un amplio registro histórico de esta enfermedad, debido principalmente a su fácil diagnóstico, además de la necesidad de un control permanente.

Desde hace 50 años hasta la fecha, la DM1 ha experimentado un aumento de entre 2 a 4 veces en el mundo, con una tasa del 3% anual entre niños de 0 a 14 años, estimándose que para el año 2010 la tasa de incidencia será un 40% mayor que la observada en 1998. En la población europea la situación es aún más dramática, observándose un aumento de más del 5% anual en la población infantil de entre los 0 y 4 años de edad. En Finlandia, el país con más alta incidencia, se estima que un 0,6% de todos los niños podrían desarrollar diabetes antes de los 15 años de edad (Onkamo, 1999; Gale, 2002; Gillespie, 2004).

Esta tendencia mundial también se ve reflejada en nuestro país, donde la DM1 ha experimentado un alza en su incidencia en todos los grupos de edad, pasando de ser una enfermedad de baja incidencia en Chile a una de incidencia intermedia. Así lo reflejan

los estudios realizados en los últimos 20 años donde la tasa de incidencia ha aumentado desde un valor promedio de 2,5/100.000 habitantes/año en el periodo 1987-1992 a cifras cercanas a los 4,5/100.000 habs/año entre 1994-2000 (García, 2003).

Además del aumento en la incidencia a nivel mundial de la DM1, un nuevo y preocupante fenómeno se ha observado recientemente: el temprano debut de la enfermedad, hecho que resultaba excepcional antes de los 6 meses de edad y que hoy resulta repetitivo (Karvonen, 1999). Este fenómeno también ha sido registrado en nuestro país confirmando la tendencia mundial, sin embargo, la tasa sigue siendo significativa en el grupo de 10 a 14 años de edad (García, 2003).

Pese al aumento generalizado de la incidencia de DM1 en el mundo, es importante destacar el hecho de que tal aumento se da de manera dispar entre los distintos países analizados, donde el componente racial y geográfico parece cobrar importancia. De esta manera, se ha observado que los países nórdicos como Suecia, Noruega y Finlandia, que muestran una alta homogeneidad en su población, tienen las cifras más altas de incidencia. Sin embargo, Estonia, país étnicamente relacionado con Finlandia, muestra una incidencia 3 veces menor que este último. De manera opuesta, los países asiáticos, que también presenta gran homogeneidad en su población, son los que presentan menores tasas de afectados (García, 2003).

También existen casos de países que presentan gran homogeneidad étnica y diferencias notables en la incidencia entre sus regiones. Es el llamativo caso de Italia, donde se registra una tasa de incidencia 5 veces mayor en la isla de Cerdeña versus la región central del país (Serrano-Ríos, 1999). Por otro lado, en países con mayores índices de mestizaje se observa gran heterogeneidad en la ocurrencia de casos diabéticos. En Estados Unidos se observa una alta incidencia de DM1 en la población de ascendencia caucásica, incidencia intermedia en la población negroide y una muy baja tasa en la población amerindia.

En Chile, al igual que USA, existe gran heterogeneidad étnica en su población. Se estima que nuestra población tiene aproximadamente un 60% de ascendencia europea, 33% amerindia y 7% africana. Estudios realizados en la población de la IX Región muestran tasas de incidencia significativamente diferentes en niños mapuches (0,42/100.000 hab/año) comparados con niños de ascendencia caucásica (1,27/100.000 hab/año) (Larrenas, 1996).

Estos datos muestran el importante rol que cumple la genética en el desarrollo de la DM1, demostrándose que el componente racial de una determinada población es determinante en el riesgo de adquirir esta enfermedad, sugiriendo la existencia de una susceptibilidad genética para adquirir la DM1, la cual sería modulada por factores ambientales de diversa índole. Actualmente, la lista de factores ambientales

involucrados en la incidencia de diabetes en el mundo ha aumentado gracias a la constante investigación que se genera en esta área tan importante de su etiología. De esta manera han resultado relevantes factores físicos tales como altitud, humedad, temperatura y latitud de la región estudiada o bien costumbres alimenticias de dicha región, a la hora de evaluar los resultados (García, 2003).

3. Factores Ambientales

Debido a la velocidad con que ha aumentado la tasa de incidencia de la DM1 en todas las poblaciones estudiadas resulta poco esperanzador buscar su explicación en alteraciones genéticas, teniendo su origen probablemente en cambios ambientales. La identificación de tales factores ha sido y sigue siendo una tarea extremadamente compleja principalmente dada la dificultad que se genera al asociar el desarrollo de la patología con algún evento pasado de exposición en el ambiente. De todas formas, se han logrado identificar varios candidatos, dentro de los cuales siguen siendo los más populares algunos tipos de virus. Especialmente sospechosos han resultado ser los enterovirus, rotavirus y la rubéola, entidades que incrementan el riesgo de generar DM1 en infantes que hayan sufrido alguna de estas infecciones (Hyoty, 2002; Honeyman, 2000). También existe evidencia sobre algunos enterovirus, como el Coxsackie B, cuya prevalencia es menor en países con altos niveles de DM1 (como Finlandia por ejemplo) que en países con baja incidencia (Viskary, 2005), observación que deja entrever la posibilidad de que en edades temprana la exposición ambiental a ciertos microbios o sus productos promovería una activación del sistema inmune innato que ayudaría a suprimir una futura respuesta autoinmune (hipótesis de la higiene) (Gale, 2002). Resultados recientes demuestran también que la infección producida por citomegalovirus (CMV) puede 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 el cual sería responsable de la autoinmunidad generada (Santos, 2000).

Debido al difícil acceso y a la delicadeza del páncreas resulta imposible tomar muestras de este órgano para estudiar la progresión de la enfermedad en pacientes diabéticos, por lo que ha resultado imprescindible la generación de modelos animales. De esta manera actualmente se cuenta con 2 modelos principales: la rata diabética BioBreeding (BB) (Mordes, 2004) y el ratón diabético no obeso (NOD) (Leiter, 2005). Gracias a estos modelos murinos existe evidencia sobre la posible participación de bacterias y sus toxinas en la patogenia de la DM1. Algunas especies del género *Streptomyces* producen citotoxinas como streptozotocina y bafilomicina A1 de las cuales se sospecha que inducen diabetes en ratones (Myers, 2003). Adicionalmente, componentes de la microflora bacteriana tales como lipopolisacáridos de la pared celular de bacterias gram-negativas podrían actuar como adyuvantes en la respuesta inmune hacia antígenos solubles (Scott, 2002).

Desde el punto de vista nutricional, experimentos en ratas han demostrado que una dieta rica en albúmina causa una mayor incidencia de diabetes, similar a la DM1 producida en humanos. Un péptido identificado como ABBOS presente en la albúmina de la leche de vaca produce un aumento significativo en la proporción de anticuerpos anti-BSA. Se piensa que dichos anticuerpos pueden estar reaccionando de manera

cruzada con proteínas de membrana en la célula β , lo que junto a un aumento detectado en la expresión de citoquinas tales como interferón γ , y la expresión de antígenos HLA de clase II sobre la membrana de la célula β , podrían precipitar su proceso de destrucción (Pérez-Bravo, 1996).

Extensos estudios en modelo animal donde se investigaron los efectos de carbohidratos, ácidos grasos, fibra, proteínas y micronutrientes en dietas semipurificadas mostraron efectos significativos de la fuente de proteínas contenida en la dieta (trigo, soya y leche de vaca) en el desarrollo de diabetes en ratones NOD y ratas BB (Scott, 1996). Interesantemente, también se encontraron fuentes de aminoácidos que cumplían un efecto retardante en el desarrollo de la DM1, destacándose el efecto que produjo una dieta basada en caseína hidrolizada. Sin embargo, aún no queda claro si esta protección es debida realmente a factores retardantes de la diabetes o simplemente se debe a la carencia de factores gatillantes (Scott, 1996).

También existe una amplia evidencia donde se señala que la variabilidad estacional estaría relacionada con la incidencia de cada país. De esta manera se ha logrado determinar que en la mayoría de los países se registra un aumento de DM1 en los meses más fríos del año. Este fenómeno que se da en ambos hemisferios del planeta, probablemente tenga relación con un aumento de las enfermedades infectocontagiosas como causa de alguno de los casos diabéticos (García, 2003). En Chile también se da

esta tendencia, sin embargo en los últimos años se ha observado un estrechamiento en las tasas de incidencia en el periodo otoño-invierno comparado con el periodo primavera-verano (Carrasco, 1996).

Aparte de estos factores, existe evidencia de otros factores como la velocidad de crecimiento de los niños y la obesidad los cuales estarían implicados en el desarrollo de la diabetes. Se ha observado que en menores de 3 años con tasas de crecimiento aceleradas la enfermedad es dos veces mas frecuente, mientras que en niños obesos el riesgo aumenta entre un 20-30%. También se registran factores perinatales como la ganancia extrema de peso de la madre o incompatibilidad de grupo sanguíneo e incluso se discute sobre factores psicológicos como el estrés (García, 2003).

En resumen, se puede observar que la DM1 es una enfermedad etiopatogénicamente muy compleja, en que hasta ahora no se ha encontrado ningún factor ambiental específico que por si sólo ponga en marcha el proceso autodestructivo de la célula β , dejando por conclusión que probablemente una interacción entre varios de ellos sea el mecanismo más probable. Actualmente una serie de estudios prospectivos se están llevando a cabo para resolver esta interrogante, como son el “Estudio para Reducir la DM1 en Población de Riesgo” (TRIGR), el estudio de “Predicción y Prevención de la Diabetes” (DIPP), el de “Autoinmunidad Diabética en la Juventud” (DAISY) y el estudio conocido como BABYDIAB. Estos estudios fueron diseñados para investigar la

real asociación entre DMI y factores tales como virus, dieta, stress, estatus socioeconómico, entre otros, en población de riesgo versus pacientes de la población general. Estos interesantes estudios cuentan con un seguimiento de una gran cantidad de participantes y sus resultados estarán disponibles dentro de aproximadamente 10 años más.

4. Factores Genéticos

Si bien existe una gran cantidad de factores ambientales involucrados en la patogénesis de la DM1, las evidencias experimentales muestran una innegable susceptibilidad genética asociada, que también presenta un alto grado de complejidad debido a su carácter poligénico. Estudios realizados en gemelos homocigóticos diabéticos demostraron que existe hasta un 50% de concordancia para que ambos presenten DM1 (Pugliese, 2004). También se ha observado que un hermano de un diabético tipo 1 tiene 10 veces más probabilidad de contraer la enfermedad comparado con un individuo de la población general (Hawa, 2002). Resultados que demuestran claramente la participación de un componente de carácter hereditario en la etiología de la DM1.

En el afán de identificar dicho componente de carácter hereditario se han llevado a cabo una serie de investigaciones que datan desde hace décadas. Actualmente se cuenta con una lista de más de 20 loci que se cree podrían incrementar el riesgo de contraer esta patología. Sin embargo, no todos tienen los mismos índices de asociación, destacándose solo 3 loci que superan los 3 MLS (Maximum Lod Score) y que han sido confirmados por el test de desequilibrio de ligamiento (TDT) (García, 2003; Anjos, 2004).

El locus genético conocido como IDDM1 (locus 1 de la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente) fue el primer locus encontrado asociado a la enfermedad y corresponde a

la región del Antígeno del Leucocito Humano (HLA) ubicado en el cromosoma 6p21. Este locus es el más importante en la etiología genética de esta enfermedad siendo responsable de cerca de la mitad del factor de riesgo hereditario asociado a la DM1. Se ha observado que existen dos haplotipos de particular importancia para este locus: DR4-DQ8 y DR3-DQ2, los cuales están presentes en un 90% de los niños caucásicos con la patología. También se ha encontrado un haplotipo considerado protector de DM1 que se encuentra en menos del 1% de la población diabética: el DR15-DQ6, el cual está presente en un 20% de la población general. En 1992 se propuso un modelo para explicar este fenómeno de susceptibilidad en el cual estarían participando ambos alelos para conformar una molécula MHC clase II cuya estructura terciaria favorecería la presentación de autoantígenos a los linfocitos T, desarrollando una respuesta autoinmune (Todd, 1987; Atkinson, 1994; Vyse, 1996).

El segundo locus génico de susceptibilidad a DM1 considerado desde hace años, es el locus IDDM2 en el cromosoma 11p15, en el cual se encuentra un polimorfismo de secuencias repetidas en tandem de número variable, localizado río arriba del gen de la insulina (INS VNTR) (Bell, 1984). Según el número de repeticiones de una unidad consenso de 15pb (ricos en G) se distinguen 3 clases de este polimorfismo: Clase I (30-60 unid.) el cual da cuenta de ~10% de susceptibilidad genética; Clase II (61-120 unid.) muy raro en la población, y Clase III (120-170 unid.) poco frecuente al cual se le asocia un efecto protector contra DM1 de 3 a 5 veces comparado con un sujeto portador del haplotipo Clase I (Bennett, 1995; 1996). Apoyados en evidencias obtenidas a partir de

experimentos en modelos KO con números variables de copias del gen de la insulina, se postula que este polimorfismo estaría modulando la expresión de insulina en el timo, en donde portadores del polimorfismo de Clase I generarían linfocitos T autoreactivos insulino-específicos debido a una pobre selección autogénica en el timo (Chentoufi, 2002), hipótesis que aún no ha sido demostrada.

Finalmente, el tercer locus con mayor impacto en la incidencia de DM1 conocido hasta ahora es el locus IDDM12 en el cromosoma 2q33, región donde se encuentra codificado el Antígeno 4 asociado al Linfocito T Citotóxico (CTLA-4) que cuenta con un MLS de 3,2 (Nistico, 1996; Morahan 1996). Este locus ha sido el blanco de muchas investigaciones y se conoce desde hace algunos años debido a su gravitante rol en la regulación del sistema inmune, siendo responsable de modular la activación de los linfocitos T. Su asociación con DM1 ha sido confirmada mediante múltiples mapeos genéticos y análisis de desequilibrio de ligamiento, que siempre apuntan a la región donde se encuentra codificado CTLA-4. Se han encontrado diversos polimorfismos en este gen con distintas frecuencias en las poblaciones donde se ha estudiado, obteniéndose distintos efectos de asociación a DM1 dependiendo de la etnia poblacional (Vaidya, 2004; Kavvoura 2005).

Actualmente, la investigación dirigida hacia el descubrimiento de nuevas regiones génicas de susceptibilidad a DM1 continúa. Recientemente se ha identificado la

variante PTPN₂₂ del gen que codifica para la Proteína Tirosina-Fosfatasa (LYP) como el cuarto factor de susceptibilidad a DM1 actuando también a través de la regulación de la respuesta del linfocito T (Bottini, 2004). Estos cuatro genes de susceptibilidad pueden verse actuando en conjunto bajo el contexto de la presentación antigénica de una célula hacia el linfocito T (Fig. 1), dirigiéndose el interés en esta interacción como clave para resolver el enigma que plantean no solo la DM1, sino que también la mayoría de las enfermedades de origen autoinmune.

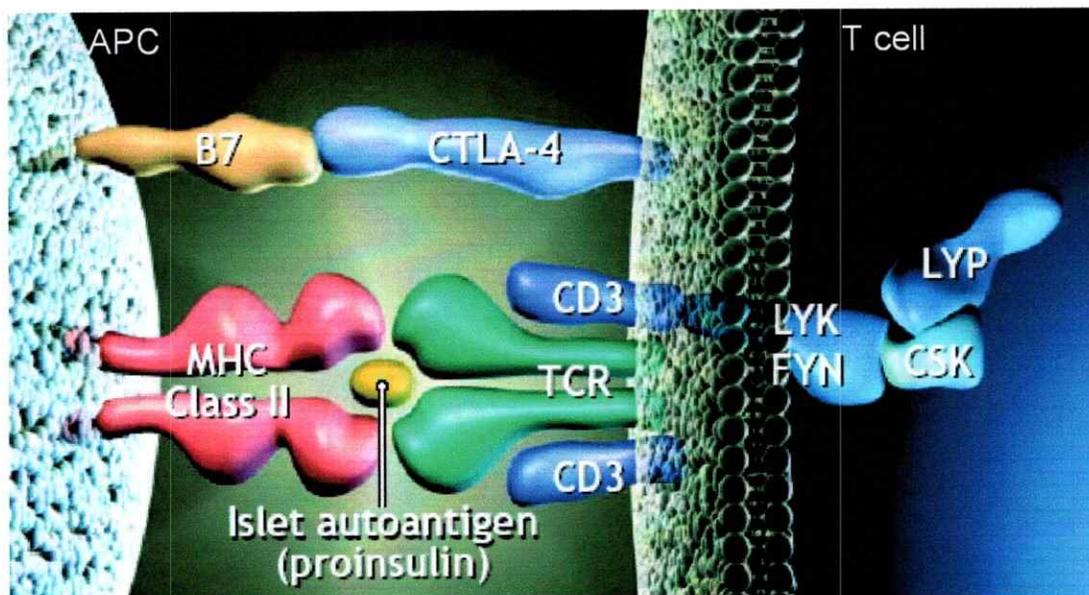


Figura 1. Diagrama donde están presentes los productos de los 4 genes principales de asociación a diabetes tipo 1. CTLA-4 inhibidor de la activación del linfocito T, proteína tirosina fosfatasa (LYP) y la molécula MHC clase II que está presentando el autoantígeno de la proinsulina (Gillespie, 2006).

5. CTLA-4

El antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico (CTLA-4), también conocido como CD152, es una glicoproteína de transmembrana tipo 1 perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Brunet, 1987). Está compuesta de 223 aa de largo, 35 de los cuales corresponden al péptido señal de la molécula. Se encuentra en forma de homodímero unido covalentemente a través de un puente disulfuro entre las cisteínas en la posición 122, y por dos N-glicosilaciones en las posiciones 78 y 110 (Dariavach, 1988; Linsley, 1995). Su tallo citoplasmático es de 36 aa de largo 100% conservados entre los mamíferos y carece de actividad enzimática, sin embargo posee áreas de interacción con moléculas de señalización citoplasmática (Baroja, 2000). La simplicidad de la estructura de esta molécula contrasta con su función crítica, que es la de regular negativamente la activación del Linfocito T y de mantener la tolerancia periférica.

Su gen se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 2q33, y en el cromosoma 1 en ratones, configurado en ambas especies con 4 exones: el exón 1 codifica para el péptido señal de la molécula, el exón 2 codifica para el sitio de unión a ligando, el exón 3 codifica para la región transmembrana de la proteína y el exón 4 codifica para el tallo citoplasmático (Dariavach, 1988). Sin embargo, el transcrito primario puede sufrir splicing alternativo, detectándose distintas variantes de CTLA-4 presentes en humanos

y ratones (Fig. 2). Existe el transcrito de largo completo (glicoproteína de transmembrana), también una isoforma que carece del exón 3 llamado CTLA-4 soluble, expresada principalmente por células T inactivas cuya función está pobremente descrita; y una rara isoforma en que está presente solo el exón 1 y 4 (Brunet, 1987; Dariavach, 1988; Ling, 1999). En ratones existe una variante adicional de esta molécula que no ha sido detectada en humanos, es la llamada CTLA-4 ligando independiente, que carece del exón 2 y se expresa en altos niveles en linfocitos T de memoria, funcionando probablemente como un atenuador de la activación de la célula T (Ueda, 2003).

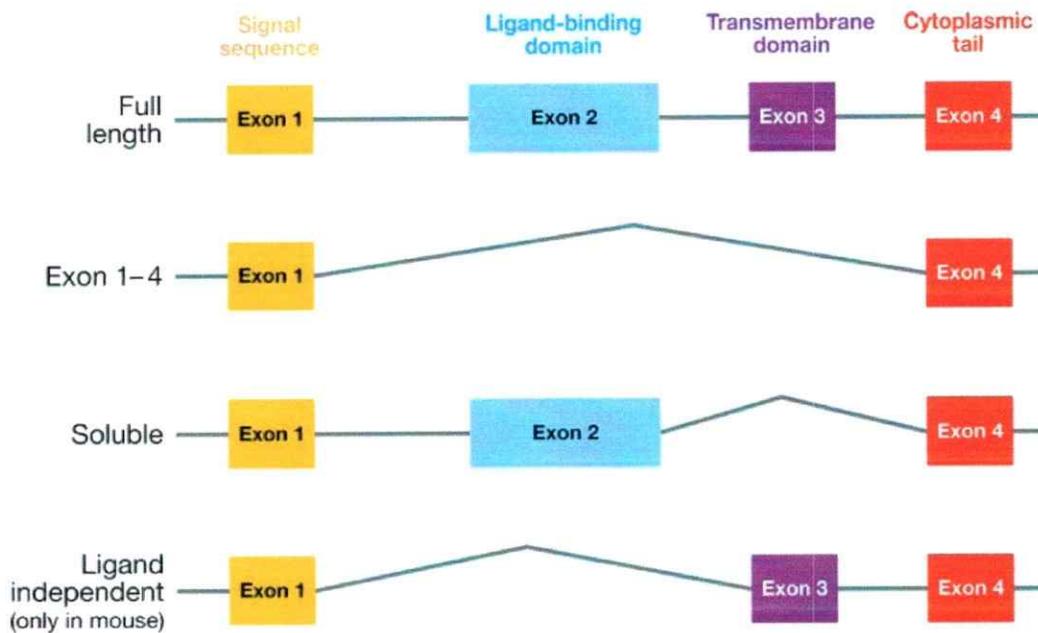


Figura 2. Variantes encontradas de CTLA-4 producto de modificaciones post-transcripcionales. En humanos se han encontrado 3 variantes: CTLA-4 de largo completo, CTLA-4 soluble y una rara forma de CTLA-4 con los exones 1 y 4. Existe otra variante encontrada solo en ratones llamada CTLA-4 ligando independiente que carece del exón que codifica para el dominio de unión a ligando (Teft, 2006).

CTLA-4 se expresa principalmente en linfocitos T activados CD8+, aunque también tiene expresión constitutiva en linfocitos T reguladores CD4+ CD25+ (Perkins, 1996). Los linfocitos T de memoria, a diferencia de los linfocitos vírgenes, tienen un gran "pool" de CTLA-4 almacenado en el citoplasma listo para ser llevado rápidamente a la superficie celular en caso de activación, permaneciendo más tiempo en la superficie antes de ser reinternalizado mediante endocitosis en comparación con un linfocito T virgen recién activado (Jago, 2004). También se ha observado la presencia de esta molécula en otros tipos celulares como linfocitos B, monocitos, granulocitos, fibroblastos placentarios y cuerpos embrionarios; desconociéndose su función precisa (Pistillo, 2003).

El ligando de CTLA-4 de largo completo es B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), moléculas que se expresan en la superficie de la Célula Presentadora de Antígeno (APC). Estas moléculas también son el ligando de su contra receptor CD28 que se expresa de manera constitutiva en el linfocito T y que cumple la función de completar su activación iniciada por la unión del Receptor del Linfocito T (TCR) con el antígeno adosado a una Molécula de Histocompatibilidad de clase II (MHC II) (Linsley, 1990; Freeman, 1993). A pesar de cumplir funciones opuestas, CTLA-4 y CD28 están codificadas en el mismo cromosoma, una al lado de la otra, compartiendo además, más del 30% de identidad proteica, concentrada especialmente en el sitio de unión a ligando (Carreno, 2002). Ambas moléculas compiten por el mismo ligando, sin embargo CTLA-4 tiene una afinidad 10 veces mayor por B7 que CD28, pero con una rápida tasa de disociación

(van der Merwe, 2003). Esta gran avidéz de CTLA-4 por sobre CD28 sugiere un predominio de señales inhibitorias dominantes sobre las señales coestimuladoras para activar al linfocito T.

Experimentos realizados en ratones KO para CTLA-4 demostraron la real importancia de esta molécula en la regulación del sistema inmune. Dichos ratones presentaron una fatal enfermedad linfoproliferativa con destrucción de múltiples órganos mediada por linfocitos T autoreactivos (Waterhouse, 1995). También se ha observado que la administración de una proteína quimérica producto de la fusión del dominio extracelular de CTLA-4 con la porción Fc de la inmunoglobulina humana IgG1 prolonga la sobrevida de transplantes y mejora desórdenes autoinmunes como DM1 y lupus en ratones (Lenschow, 1992, 1995). Otra evidencia sobre el rol de CTLA-4 provino del efecto de capturar anticuerpos contra CTLA-4 lo que produjo una mayor activación de linfocitos T (Walunas, 1994). Por otra parte, se ha observado que la aplicación de bloqueadores de CTLA-4 en ratones aumenta la inmunidad antitumoral y la respuesta a infecciones, precipitando también la aparición de DM1 en ratones NOD (Leach, 1996; Luhder, 1998).

A raíz de estos hallazgos surgen dos posibles mecanismos de acción de esta molécula: CTLA-4 podría inhibir la actividad del linfocito T mediante una competencia con la molécula que lo activa (CD28); o bien CTLA-4 podría estar transduciendo una señal

negativa que interfiere en la vía de señalización a través de quinasas asociadas al TCR (Lck, Fyn y ZAP-70), las cuales en ausencia de CTLA-4 desembocan en la transcripción nuclear de genes involucrados en proliferación celular y en la producción de citoquinas (Marengere, 1996). También se ha demostrado que CTLA-4 modula eventos de señalización muy tempranos mediante una interacción directa con la cadena CD3 ζ del complejo TCR (Lee, 1998).

6. Polimorfismos de CTLA-4

Se han descrito varios polimorfismos en el locus de CTLA-4, de los cuales 3 han sido bien estudiados y han llamado la atención: una sustitución T por C en la posición -318 (-318C/T) (Deichmann, 1996), una repetición de un dinucleótido AT en la región 3' del gen ((AT)_n) (Harper, 1996) y una sustitución de G por A en la posición +49 (+49A/G) (Nistico, 1996) (Fig. 3).

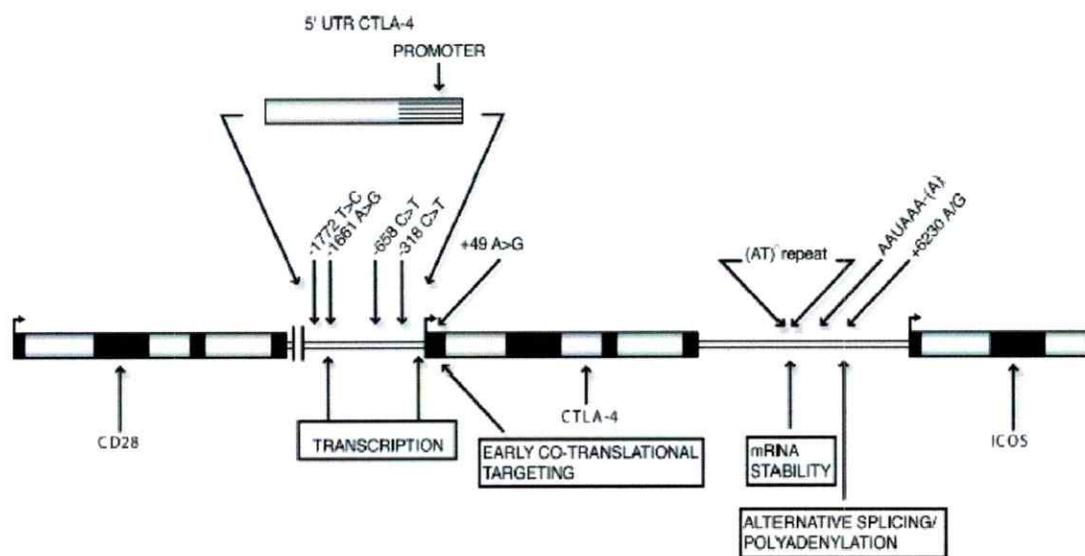


Figura 3. Polimorfismos encontrados en las proximidades del gen de CTLA-4. Existen múltiples polimorfismos que flanquean la región génica de CTLA-4. Nuestro estudio se centró en el polimorfismo C-318T ubicado en la región promotora del gen y en el A+49G, único polimorfismo encontrado en una región codificante del gen de CTLA-4 (exón 1) (Anjos, 2004).

De estos 3 polimorfismos el que ha presentado una mayor asociación con DM1 según diversos estudios en distintas poblaciones, es el +49A/G. Este es el único polimorfismo encontrado en CTLA-4 que se encuentra en una región codificante de la proteína. Este genera un cambio aminoacídico de una treonina por una alanina en la posición 17 correspondiente al péptido señal. Un meta análisis realizado para estos polimorfismos determinó que los portadores del alelo G (+49A/G) son 1,45 veces más susceptibles a DM1 que los portadores del alelo A (OR = 1,45; $p < 0,001$). Además, los portadores de un genotipo homocigoto G/G tienen el doble de riesgo que los heterocigotos, sugiriendo un modelo de codominancia en su expresión. Los otros polimorfismos a pesar de la gran cantidad de estudios realizados, no presentan una asociación promedio significativa a DM1 (-318C/T OR = 0,93; (AT)_n OR = 0,99) (Kavvoura, 2005). Sin embargo, se presentan variaciones de riesgo entre las distintas poblaciones estudiadas.

7. Antecedentes Serológicos de la Diabetes tipo 1

La destrucción de las células β 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 (Ziegler, 1999). Esta destrucción celular mediada por linfocitos T se desarrolla a partir de la acción de diversas moléculas citotóxicas como citoquinas, perforinas o mediante señales apoptóticas a través de la vía Fas. De esta manera, se ha determinado que las citoquinas IL-1 e INF- γ son capaces de inducir la expresión de Fas en la superficie de la célula β (Loweth, 1998). Existen además otras citoquinas producidas por un grupo de linfocitos T helper 1 (Th1) capaces de exacerbar la autoinmunidad celular, entre ellas destacan IL-2, IL-12, IL-18 y TNF- α (Mosmann, 1989) (Fig. 4).

Además, se han detectado citoquinas producidas por linfocitos Th2 y Th3 que protegen al islote pancreático de la destrucción β celular, tales como IL-4, IL-5, IL-10 y TGF- β (Mosmann, 1989). Estas citoquinas crean un balance inmunológico el cual podría verse afectado por un eventual aumento en la población de linfocitos Th1, evento que precipitaría la reacción autodestructiva de la DM1.

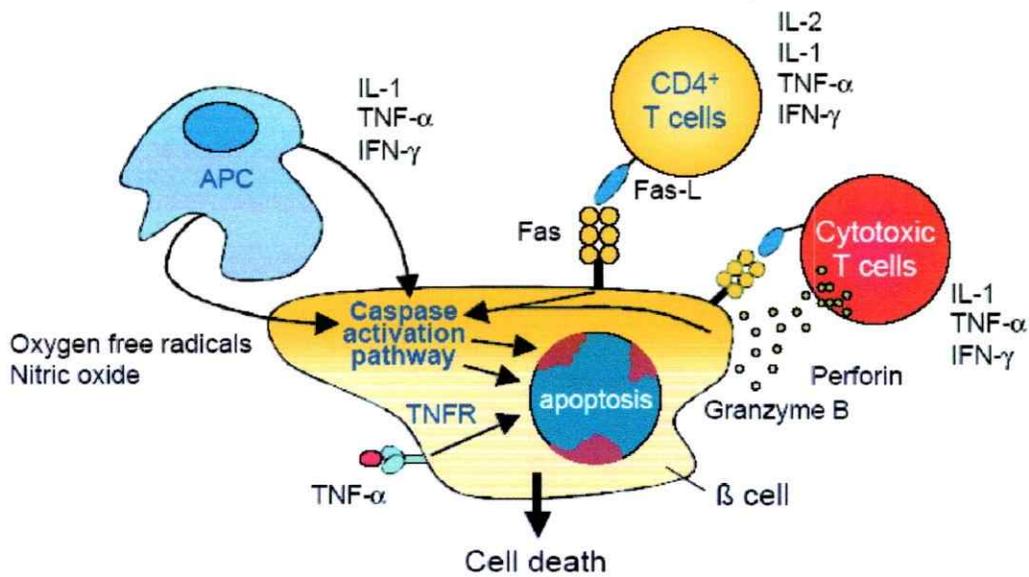


Figura 4. Mecanismos de destrucción de la célula β en la diabetes tipo 1. (Kawasaki, 2004)

La destrucción de la célula β conlleva la aparición de anticuerpos contra proteínas del medio interno celular. Hace más de 30 años se conoce la existencia de anticuerpos en el suero de pacientes diabéticos que son capaces de unirse a diferentes secciones del islote pancreático. Los 3 principales autoantígenos conocidos son la descarboxilasa del ácido glutámico (anticuerpo GAD-65) (Baekkeskov, 1989), una proteína Tirosina-fosfatasa (IA-2) (Bach, 2005) y la insulina (IAA) (Palmer, 1987). Se han realizado numerosos esfuerzos por estandarizar los ensayos de detección de dichos anticuerpos, describiéndose que cerca de un 90% de los pacientes de reciente diagnóstico tienen anticuerpos de al menos 1 de los 3 autoantígenos señalados (Bingley, 2003). Existe, sin embargo, cierta variabilidad en tales patrones humorales, encontrándose mayor prevalencia de anticuerpos contra insulina (IAA) en los pacientes más jóvenes; un

decrecimiento en el título de anticuerpos IA-2 después del diagnóstico, y una persistencia del anticuerpo GAD-65 (Gorus, 1997; Decochez, 2000).

8. Hipótesis

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados nos hemos planteado la siguiente hipótesis: “existe asociación entre el polimorfismo +49A/G y el -318C/T del antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) y la Diabetes tipo 1 en población chilena. Asociación que se modifica con la presencia o ausencia de anticuerpos contra GAD65 e IA-2 o por las citoquinas TGF- β , TNF- α , INF- γ e IL-1 β ”.

9. Objetivos

9.1 Objetivo General

- Analizar la posible asociación entre los polimorfismos genéticos de CTLA-4 y diabetes tipo 1 en población chilena y estimar si la asociación se modifica de acuerdo a la presencia o ausencia de anticuerpos y citoquinas en un estudio de caso-control y en un diseño de tipo intrafamiliar (tríos).

9.2 Objetivos Específicos

- Estimar la frecuencia de las variantes genéticas de CTLA-4 (+49A/G y -318C/T) en la población diabética, niños controles y en los padres de los casos afectados.
- Evaluar la transmisión preferencial de haplotipos CTLA-4 para susceptibilidad o protección en la diabetes tipo 1 en población chilena.
- Determinar mediante ELISA la presencia de anticuerpos IA-2 y GAD65 en muestras de sueros de pacientes diabéticos y en controles sanos.
- Determinar mediante ELISA la presencia de las citoquinas TGF- β , TNF- α , INF- γ e IL-1 β en muestras de sueros de pacientes diabéticos y en controles sanos.
- Estratificar respuesta de anticuerpos y citoquinas según genotipos y haplotipos de CTLA-4.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Participantes del Estudio

En este estudio participaron 167 niños debutantes con diabetes tipo 1 de la Región Metropolitana con un rango de edad de 2 - 14 años provenientes de los Hospitales San Juan de Dios, Ezequiel González Cortés y San Borja Arriarán. El diagnóstico de DM1 fue realizado en base al criterio utilizado por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) (Silverstein 2005). Las muestras de sangre fueron colectadas en cada 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 184 muestras de niños sanos (grupo control) cuyo rango de edad y estrato socioeconómico fue similar al grupo de niños diabéticos. Para el estudio de transmisión intrafamiliar (estudio de tríos), participaron 90 padres de casos diabéticos a partir de los cuales fue posible realizar el análisis de desequilibrio de transmisión (TDT) (Santos, 2002).

2. Diseño de Estudio

Para estudiar la posible asociación entre los polimorfismos de CTLA-4 y la 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.

Para evitar la aparición de asociaciones de tipo no causal genotipo-enfermedad que sean debidas a estratificación genética poblacional, también se realizó un estudio de asociación de base familiar donde participaron los casos incidentes con DM1 y sus progenitores (diseño de tríos) (Cardon, 2003).

3. Extracción de DNA

De cada uno de los participantes de este estudio se colectaron aproximadamente 3 mL de sangre periférica, la cual fue centrifugada a 1500 RPM en centrifuga clínica para separar el suero de las partículas en suspensión (eritrocitos, linfocitos y plaquetas principalmente). Se almacenaron 500 μ L del suero de cada muestra para análisis

posteriores, mientras que las células precipitadas fueron sometidas al proceso de extracción de DNA con el método de Chomczynski. Para ello se mezcló el residuo o "pellet" con tampón de lisis (sacarosa 0,32M; Tris 10mM pH7,5; MgCl₂ 5mM; Tritón X-100 1%) en proporción 1:5 y centrifugando a 4000 RPM durante 10 minutos. Después de repetir este proceso 3 veces se resuspendió el residuo lisado con 1 mL de solución Chomczynski (CH₅N₃ x HSCN + H₂O; Winkler Ltda., Chile). Después de 1 hora se agregaron 4 mL de etanol frío absoluto y se centrifugó a 4000 RPM durante 3 minutos. Después de repetir 3 veces este proceso el residuo se secó para luego rehidratarlo con 150 µL de NaOH 8mM.

El DNA obtenido fue cuantificado a 260 nm, longitud de onda en la cual absorben las bases nitrogenadas; y también fue cuantificado a 280 nm lugar del espectro donde absorben las proteínas. La razón entre ambos valores de absorbancia da cuenta de la pureza de cada muestra. Las medidas fueron realizadas en un GeneQuant (Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

4. Genotipificación

Para determinar el genotipo del gen de CTLA-4 y cada uno de los polimorfismos estudiados A+49G y C-318T en cada una de las muestras se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior análisis de fragmentos de restricción (RFLP). Para tal efecto se amplificó una región de 162 pb localizado en el exón 1 de dicho gen que contenía el polimorfismo A+49G. Los partidores utilizados para este análisis fueron: forward 5'-GCTCTACTTCCTGAAGACCT-3' y reverse 5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3'. El polimorfismo C-318T fue amplificado con los partidores forward 5'-AAATGAATTGGACTGGATGGT-3' y reverse 5'-TTACGAGAAAGGAAGCCGTG-3' resultando un producto de 247 pb. Cada reacción de PCR fue realizada en 20 µL de solución conteniendo 5 pmoles de cada par de partidores, 50 ng de DNA de cada una de las muestras, 200 µM de cada dNTP y 0,5 U de Taq-Polimerasa. La reacción de PCR se estandarizó en un periodo de 10 minutos a 95°C para la activación de la enzima, seguido de 40 ciclos que consistieron en un periodo de denaturación del DNA a 95°C por 30 segundos, un periodo de unión de los partidores a 56°C por 30 segundos y un periodo de extensión de la polimerasa a 72°C por 30 segundos, con un periodo de extensión final a 72°C durante 15 minutos. Para realizar el PCR se ocupó un Termociclador Biometra^R (Alemania).

Para llevar a cabo el análisis RFLP se tomaron 5 μ L de cada producto de PCR que fue incubado a 37°C durante toda la noche con 0,5 U de la endonucleasa de restricción apropiada para cada polimorfismo (MseI para C-318T y BbvI para A+49G). El producto de digestión fue visualizado en un gel de agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio (Fig. 5).

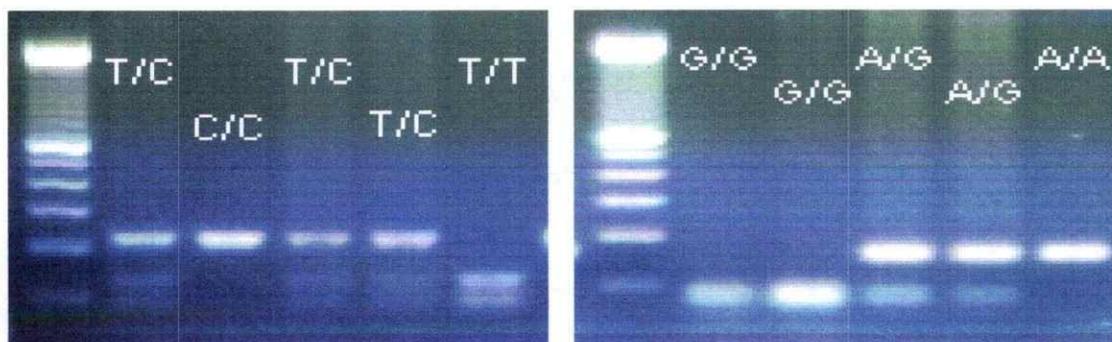


Figura 5. Fotografía de un gel de agarosa con productos de cortes de distintas muestras para ambos polimorfismos estudiados.

Para el caso del polimorfismo A+49G el tamaño observado de la banda de amplificación después de la electroforesis correspondió con las 162 pb esperadas. Después del tratamiento con la enzima BbvI, aquellas muestras que presentaban el SNP G en una de sus hebras fueron digeridas dando origen a 3 bandas: la de 162 pb correspondiente al producto de amplificación intacto sin el SNP, más dos bandas de 90 y 74 pb producto del corte enzimático en la otra hebra. En las muestras homocigotas para el SNP (genotipo G/G) ambas hebras fueron cortadas desapareciendo la banda de amplificación, ocurriendo lo contrario para el caso de las muestras sin el SNP en ninguna de sus hebras (genotipo A/A).

Para el polimorfismo C-318T el tamaño observado de la banda de amplificación correspondió con las 247 pb esperadas. Después del tratamiento con la endonucleasa MseI, aquellas muestras que presentaban el SNP T en una de sus hebras fue digerida dando origen a 3 bandas: la de 247 pb correspondiente al producto de amplificación más dos bandas de 132 y 117 pb producto del corte enzimático. En las muestras homocigotas para el SNP (genotipo T/T) ambas hebras fueron cortadas desapareciendo la banda de amplificación, ocurriendo lo contrario para el caso de las muestras sin el SNP en ninguna de sus hebras (genotipo C/C) (Fig. 5)

5. Análisis Serológico

Los anticuerpos anti-GAD65 y anti-IA2 fueron determinados mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) con el uso de kits comerciales de la marca Medizym^R (Berlín, Alemania). Ambos ensayos están basados en la habilidad de los anticuerpos de formar un puente entre el antígeno respectivo unido a la placa de ELISA (GAD65 e IA2) y un segundo anticuerpo biotinilado. La unión de este segundo anticuerpo se correlaciona con la cantidad de anticuerpo a determinar presente en el suero estudiado, siendo cuantificado mediante la adición de estreptavidina-peroxidasa más un sustrato colorogénico (3,3',5,5'-tetrametilbencidina; TMB). Después de incubado durante el tiempo indicado por el fabricante la placa fue leída en un lector óptico ASYS Hitech

GmbH^R (Austria) a 450 nm y a 620 nm a modo de control. La detección de anticuerpos se llevó a cabo de manera semi-cuantitativa 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” o con presencia del anticuerpo en cuestión.

Las citoquinas IL-1 β , TNF α , TGF β e INF γ fueron determinadas también mediante ELISA para lo cual se emplearon kits comerciales obtenidos de BioSource^R (California, USA). Todos ellos, al igual que los kits de determinación de anticuerpos, están diseñados bajo el modelo de inmunoensayo tipo sándwich, en donde el anticuerpo monoclonal respectivo para la citoquina a determinar se encuentra unida a la placa de ELISA. De esta manera las citoquinas se unen a este anticuerpo para luego, en una segunda etapa de incubación, unirse a un segundo anticuerpo biotinilado. La unión de este complejo es revelado mediante la adición de la enzima conjugada streptavidina-peroxidasa más el sustrato colorogénico TMB. Después de incubar la placa durante el tiempo y las condiciones indicadas por el fabricante la placa fue leída en un lector óptico ASYS a 450nm y 620nm a modo de control.

6. Análisis Estadístico

Tanto el análisis de las frecuencias alélicas y genotípicas en el estudio caso-control como el porcentaje de autoanticuerpos entre los pacientes diabéticos y el grupo control fueron llevados a cabo con la prueba estadística de χ^2 mediante el software STATA 9.1, el cual también se utilizó para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg en el estudio caso-control (p value < 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo). Por su parte en el estudio intrafamiliar los datos fueron tratados con el test de desequilibrio de transmisión (TDT) (Santos, 2002).

Para la realización de comparaciones entre los distintos grupos de datos se ocuparon herramientas estadísticas distintas dependiendo del tipo de distribución de las variables. En el caso de variables con distribución normal se utilizó estadística paramétrica (t-Student). Para las variables sin distribución normal los valores fueron expresados como mediana y rango, utilizándose la prueba estadística de Mann-Whitney para su análisis.

RESULTADOS

1. Análisis Genético

Mediante la técnica de PCR y posterior análisis de RFLP fue posible determinar el genotipo de cada una de las muestras analizadas en los distintos tipos de estudios (Fig. 5). Los resultados de las frecuencias alélicas en el estudio caso/control para cada uno de los polimorfismos se muestra en la tabla 1, que contó con los datos aportados por 167 casos y 184 controles.

Tabla 1. Frecuencia alélica en el estudio caso-control para los polimorfismos +49A/G y -318C/T del gen de CTLA-4.

grupo	+49A/G		-318C/T	
	alelo A	alelo G	alelo C	alelo T
CASO	200 (62,5%)	120 (37,5%)	283 (91,9%)	25 (8,1%)
CONTROL	240 (67,4%)	116 (32,6%)	321 (90,7%)	33 (9,3%)

Ambos grupos de estudio se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo -318 C/T, mientras que para el polimorfismo +49 A/G el grupo de pacientes diabéticos está en equilibrio y el grupo control se encuentra marginalmente en desequilibrio (p de Pearson = 0,015).

De la tabla 1 se puede ver claramente que el alelo G del polimorfismo en la posición +49 tiene una frecuencia mayor en ambos grupos de estudio en comparación con el alelo T del otro polimorfismo estudiado. También se observó que el alelo G fue más frecuente en el grupo de casos diabéticos que en el control, pero no alcanzó un nivel de significancia estadística. El otro polimorfismo no presentó mayores diferencias en sus frecuencias alélicas entre ambos grupos de estudio.

Se realizó un análisis genotípico para estudiar la posible asociación de algún genotipo de CTLA-4 con la enfermedad, resultados que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Frecuencias genotípicas entre casos y controles para los polimorfismos +49A/G y -318C/T del gen de CTLA-4.

POLIMORFISMO	GENOTIPO A+49G	FRECUENCIA CASOS	FRECUENCIA CONTROLES
A+49G	A/A	67 (41,9%)	88 (49,4%)
	A/G	66 (41,3%)	64 (36%)
	G/G	27 (16,9%)	26 (14,6%)
C-318T	C/C	131 (85,1%)	147 (83,1%)
	C/T	21 (13,6%)	27 (15,3%)
	T/T	2 (1,3%)	3 (1,7%)

Si bien los resultados de la tabla 2 no muestran diferencias significativas en las frecuencias de ningún genotipo entre ambos grupos, se puede ver que el genotipo A/G es más frecuente en el grupo diabético que en el sano. Además, la frecuencia de este genotipo junto al genotipo G/G se presentan cerca de un 8% con mayor frecuencia en el grupo de niños diabéticos en comparación al grupo control.

Finalmente, para completar este análisis realizamos un estudio de haplotipos cuyo resultado se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Frecuencias haplotípicas relevantes entre casos y controles para los polimorfismos +49A/G y -318C/T del gen de CTLA-4.

HAPLOTIPO +49 -318	FRECUENCIA CASOS	FRECUENCIA CONTROLES	ODDS RATIO
A - C	55,1%	58,2%	0,882
A - T	8,2%	9,4%	0,861
G - C	36,7%	32,5%	1,208

De los resultados expuestos en esta tabla se puede inferir que la presencia del haplotipo normal para estos polimorfismos (A-C) podría tener un pequeño papel protector de la DM1, mientras que el haplotipo G-C presenta un riesgo de asociación a DM1 de un 37% sobre el haplotipo normal (1,208/0,882).

Por otro lado, el estudio de asociación intrafamiliar contó con la participación de 90 tríos, donde tanto las muestras de los padres como de los hijos afectados fueron analizadas genéticamente siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el estudio caso/control. Los datos genotípicos obtenidos fueron analizados según el test de desequilibrio de transmisión (TDT), realizado con un software computacional (STATA). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados TDT para cada polimorfismo en 90 tríos caso-padres.

POLIMORFISMO	A+49G	C-318T
Proporción Transmisión SNP	51/91	12/24
Porcentaje Transmisión	56%	50%
p-value	0,2945	1,00

De acuerdo al porcentaje de transmisión calculado, se observa una tendencia de transmisión preferencial del alelo G en el caso del polimorfismo A+49G (56%), mientras que el otro polimorfismo se ajusta perfectamente a las leyes mendelianas de transmisión.

También se realizó un análisis de transmisión por genotipo para ver si existe alguno en particular que se transmita en forma preferencial considerando ambos polimorfismos. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados TDT por genotipo para cada uno de los polimorfismos.

GENOTIPO	AA/CC	AA/TC	GA/CC	GG/CC
p-value	0,1883	0,2265	0,4208	0,1815
p-value global	0,03925			

Si bien, en forma individual no se observan preferencias de transmisión genotípica estadísticamente significativas de padres a hijos diabéticos, se destaca una tendencia de transmisión genotípica preferencial: el genotipo GG/CC que representa un 17% del total de tríos estudiados, situación que podría hacerse significativa aumentando la población en estudio.

2. Análisis Serológico

2.1 Anticuerpos

La cuantificación de la presencia de anticuerpos específicos contra elementos del páncreas como son los anticuerpos GA65 e IA2 en el estudio que contempló el grupo de pacientes diabéticos y el grupo control, se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Presencia serológica de anticuerpos GAD65 e IA2 en el estudio caso-control.

ANTICUERPO	CASOS (n=153)		CONTROLES (n=140)	
	n	%	n	%
anti-GAD65	n=84	54,9%	n=2	1,4%
anti-IA2	n=81	52,9%	n=3	2,1%
GAD65 + IA2	n=49	32,0%	n=0	0%

Se puede ver que más de la mitad de los pacientes diabéticos muestra presencia de al menos uno de los dos anticuerpos analizados, mientras que en el grupo control la detección de dichos anticuerpos fue prácticamente nula. Con el fin de correlacionar la presencia de estos anticuerpos con los datos genéticos obtenidos a partir del análisis de

los polimorfismos estudiados, se cruzaron ambos grupos de datos, cuyos resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Presencia de anticuerpos GAD65 e IA2 agrupados según los genotipos CTLA-4 más relevantes.

GENOTIPO CTLA-4	Anti-GAD65		Anti-IA2	
	presencia	%	presencia	%
AA/CC	19/40	47,5	21/40	52,5
AA/TC	6/14	42,8	8/14	57,1
GA/CC	25/53	47,2	26/53	49,1
GG/CC	15/22	68,2	12/22	54,5

Se puede observar que la mayor presencia del anticuerpo GAD65 se obtuvo en los pacientes con genotipo GG/CC (n=22) para el gen de CTLA-4 ($p < 0.04$). Por su parte, el anticuerpo IA-2 presentó una mayor homogeneidad en su distribución genotípica, destacándose el genotipo AA/TC (n=17) que presenta el mayor porcentaje de presencia del anticuerpo.

Si bien estos resultados presentan un bajo poder estadístico debido al pequeño número de pacientes que presentan dichos genotipos relevantes, estos resultados muestran una tendencia que podría ser confirmada con un número mayor de muestras. Para aminorar

este efecto y también para correlacionar la presencia de estos anticuerpos con la presencia de algún alelo en particular, los datos fueron agrupados por alelos, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Presencia de anticuerpos GAD65 e IA2 agrupados según presencia de alelos de CTLA-4 en el grupo de casos diabéticos estudiados.

Polimorfismo	alelo	Anti-GAD65		Anti-IA2	
		presencia	%	presencia	%
A+49G	G	45/80	56,3	42/80	52,5
	A	27/56	48,2	30/56	53,6
C-318T	T	13/21	61,9	13/21	61,9
	C	59/115	51,3	59/115	51,3

Se puede observar a partir de esta tabla que la presencia del alelo G del polimorfismo +49A/G está relacionado con una mayor presencia de anticuerpo GAD65 en comparación con el alelo A, mientras que la presencia del anticuerpo IA2 no se ve afectada mayormente por ningún alelo en particular de dicho polimorfismo. Distinto es el efecto que se observa en el polimorfismo -318C/T donde la presencia de ambos anticuerpos alcanza un 61,9% (n=21) en los pacientes que presentan el alelo T, diferencia mayor al 10% con respecto a los pacientes con alelo C para dicho polimorfismo.

2.2 Citoquinas

Los resultados del análisis cuantitativo de las citoquinas, TNF α , TGF β e INF γ en el suero de pacientes diabéticos y de niños sanos obtenidos a partir de kits comerciales de cuantificación por el método de ELISA, se muestran en la tabla 9. La citoquina IL-1 β no fue considerada en este análisis ya que su presencia quedó fuera del límite inferior de detección para el kit utilizado en la mayoría de las muestras.

Tabla 9. Cuantificación de las citoquinas TNF α , TGF β e INF γ en sueros de pacientes diabéticos y muestras controles.

	TNF α (pg/mL)		TGF β (μ g/mL)		INF γ (pg/mL)	
	caso	control	caso	control	caso	control
Mediana	1,3	23,9	10,733	9,407	86,5	90,1
Rango	0 – 203,9	0 – 186,9	0,72 – 96,5	5,4 – 20,3	0 – 228,8	11 – 117,9
n	131	33	158	70	160	68

Como los datos obtenidos no tienen una distribución normal se utilizó el valor de la mediana en vez del promedio por ser una medida más representativa de cada citoquina en ambos grupos de nuestro estudio (datos no mostrados).

Los resultados de la tabla 8 no muestran diferencias significativas en la presencia de estas citoquinas en los grupos de estudio. La única citoquina que muestra una diferencia importante predominando en el grupo control es TNF α , sin embargo debido al amplio rango de distribución de datos en ambos grupos resulta imposible confirmar plenamente esta tendencia.

La tabla 10, muestra la distribución de los datos para el estudio de la posible relación entre los polimorfismos de CTLA-4 con los niveles serológicos de citoquinas.

Tabla 10. Cuantificación de citoquinas TNF α , TGF β e INF γ en sueros de pacientes diabéticos según los genotipos CTLA-4 más relevantes.

Genotipo CTLA-4	TNF α (pg/mL)	TGF β (μ g/mL)	INF γ (pg/mL)
AA/CC (n = 42)	2,17	11,215	105,0
AA/TC (n = 13)	1,66	10,069	84,14
GA/CC (n = 57)	1,31	11,335	87,28
GG/CC (n = 22)	5,56	9,406	114,8

Se observó que los pacientes con genotipo GA/CC para los polimorfismos de CTLA-4 estudiados presentan la mayor concentración promedio de la citoquina TGF β 1 encontrada en los sueros de dichos pacientes, mientras que aquellos con genotipo GG/CC tienen la menor concentración de ella. Exactamente lo contrario ocurre para

TNF α que, en un orden de magnitud mucho menor, presenta su mayor concentración en pacientes con genotipo GG/CC y la menor en pacientes GA/CC. INF γ también mostró su mayor concentración en pacientes con genotipo GG/CC al igual que TNF α , mientras que su menor concentración se encontró en pacientes con genotipo AA/TC.

Finalmente, incluimos un análisis genotípico caso/control de las dos citoquinas que nos parecieron más relevantes en este estudio como son TGF β e INF γ . Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Cuantificación de las citoquinas TGF β e INF γ en casos y controles agrupados según genotipo CTLA-4 más relevantes.

Genotipo CTLA-4 (+49AG – 318 CT)		TGF- β 1 (μ g/mL)		INF- γ (pg/mL)	
		caso	control	caso	control
AA – CC	mediana	11,22	11,22	104,9	90,43
	rango	2,21 – 81,3	7,06 – 20,1	0 – 229	76,3 – 113
	N	42	7	42	7
GA – CC	mediana	11,34	11,34	87,28	96,32
	rango	1,1 – 86,6	7,24 – 14,8	0 – 175	11 – 117
	N	56	10	57	10
GG – CC	mediana	9,41	7,23	114,8	86,5
	rango	3,42 – 67,6	6,7 – 11,7	0 – 160	84,1 – 94,4
	N	22	4	22	4

Se puede observar que TGF β 1 presenta una mayor concentración en pacientes diabéticos con genotipo GG/CC en comparación con el grupo control, mientras que los otros genotipos no registraron diferencias entre ambos grupos. INF γ por su parte mostró

diferencias en los 3 genotipos estudiados, destacándose también el genotipo GG/CC que presentó la mayor concentración de esta citoquina en pacientes diabéticos que en los controles.

Debemos mencionar que la citoquina IL-1 β fue prácticamente indetectable en este estudio. Cabe destacar también que los datos correspondientes a los genotipos GA/TC y AA/TT no fueron considerados en ningún análisis debido a su baja representatividad en la población estudiada (7 pacientes en total para ambos genotipos).

3. Análisis Clínico

Para finalizar este estudio realizamos un análisis de los datos clínicos obtenidos a partir de las encuestas realizadas a los padres de todos los niños diabéticos participantes de este estudio. Los datos más interesantes fueron agrupados en la tabla 12 según los genotipos CTLA-4 más relevantes, como se muestra a continuación.

Tabla 12. Datos clínicos de pacientes diabéticos agrupados según genotipos CTLA-4 relevantes.

Genotipo CTLA-4	Edad (años)	Peso Nacimiento (kg)	Peso al Debut (kg)	Meses Lactancia	Cetoacidosis al debut	Talla debut (mt)	Glicemia al debut (mg/dL)
AA/CC	10,5	3,25 ± 0,5	33 ± 14,8	6	69,2%	1,31 ± 0,3	504 ± 155
AA/TC	10,5	3,19 ± 0,34	45,1 ± 24,9	6	75,0%	1,49 ± 0,27	593 ± 265
GA/CC	11	3,32 ± 0,43	38 ± 17,8	6	71,4%	1,39 ± 0,28	511 ± 185
GG/CC	8	3,1 ± 0,78	40,2 ± 16,7	7	85,7%	1,39 ± 0,23	651 ± 190*

* p < 0.02

Se puede observar que los pacientes con genotipo GG/CC tienen una edad promedio de 8 años, casi 3 años más joven que el resto de los pacientes. También presentan el mayor porcentaje de cetoacidosis al debut y una significativa mayor glicemia al debut (p < 0.02).

DISCUSIÓN

Debido a la importancia que muestra CTLA-4 en la modulación de la respuesta inmune, esta molécula ha sido objeto de innumerables estudios desde hace varios años con el fin de establecer su relación con patologías de origen autoinmune. De esta manera, se han realizado múltiples análisis genéticos que evidencian la existencia de varios polimorfismos en las proximidades del gen de CTLA-4, de entre los cuales figuran los polimorfismos A+49G y C-318T como dos locus importantes de asociación con enfermedades autoinmunes, y en particular con diabetes tipo 1, en distintas poblaciones a nivel mundial. Sin embargo, dichos estudios muestran una amplia heterogeneidad en sus resultados, razón por la cual consideramos apropiado estudiar la asociación de dichos polimorfismos con la diabetes tipo 1 en población chilena.

En este contexto, nuestro estudio mostró que efectivamente el polimorfismo A+49G tiene una asociación mayor que el polimorfismo C-318T con esta enfermedad. Sin embargo, ningún polimorfismo alcanzó un nivel de relevancia como para ser considerado un marcador genético de la DM1. Estos resultados no son sorprendentes, ya que a una conclusión similar llegaron los autores de un meta-análisis de 33 estudios que examinó la asociación de CTLA-4 con la DM1 (Kavvoura, 2005). Dichos investigadores encontraron que el único polimorfismo que estaba claramente asociado a la diabetes tipo 1 correspondía a la variante A+49G, aunque existe una gran heterogeneidad en los resultados de los estudios analizados (Anexo, Fig.A). A pesar de

que en nuestro estudio no se alcanzó significancia estadística, el polimorfismo A+49G mostró una tendencia interesante de asociación con la enfermedad. El alelo G estuvo presente un 5% más en los pacientes diabéticos comparado al grupo control, mientras que los genotipos portadores de este alelo (A/G y G/G) fueron cerca de un 8% más frecuentes en el grupo de niños diabéticos.

Por otra parte, el polimorfismo de la región promotora C-318T no mostró ningún efecto de asociación positiva a DM1, sino que al contrario, nuestros resultados sugieren un leve efecto protector a dicha patología. Esto concuerda con los hallazgos de un grupo de investigadores asiáticos que informan de una alta actividad promotora asociada con el alelo T-318, incrementando la expresión de CTLA-4 en experimentos realizados con luciferasa como proteína reportera (Wang, 2002). También concuerda con la idea planteada por el grupo de Kavvoura y colaboradores, quienes se apoyan en la evidencia aportada por un estudio de desequilibrio de ligamiento entre varios polimorfismos de CTLA-4 para proponer una idea similar (Turpeinen, 2003). Sin embargo, existen otros resultados que difieren de los hallazgos encontrados por un grupo de investigadores asiáticos donde sí se observa que el polimorfismo -318C/T está asociado a DM1 en población Taiwanesa (Lee, 2001), confirmándose una vez más el hecho de que los factores de riesgo genéticos encontrados hasta la fecha no son absolutamente comparables entre las distintas poblaciones humanas, probablemente debido a la activa participación de factores ambientales en la etiología de la enfermedad. De esta manera se genera la discusión acerca del posible rol que podría tener este raro alelo en la

transcripción de CTLA-4 debido a la cercanía con la zona promotora, dado que hasta la fecha, la regulación transcripcional de CTLA-4 es solo parcialmente conocida. Sólo se sabe que probablemente esta se inicie cerca de 335pb río arriba de su codón de inicio (Ling, 1999) y que puede ser dependiente del factor de transcripción NFAT, entre otros (Finn, 1997).

A diferencia de los otros polimorfismos encontrados en el gen de CTLA-4, el A+49G es el único localizado en una zona codificante de la molécula. Específicamente se ubica en el exón 1 que codifica para el péptido señal de la proteína generando una sustitución aminoacídica de una treonina por una alanina en la posición 17 (Anjos, 2004). El péptido señal cumple la importante función de dirigir el polipéptido nascente del ribosoma a través del anclaje de la maquinaria celular de traslación hacia la membrana plasmática, lugar de destino de CTLA-4. Este péptido señal posteriormente es removido y no forma parte de la proteína madura. Existe evidencia a través de experimentos *in vitro* con células Cos1 donde la presencia del alelo Ala17 se correlacionó con una disminución de ~30% en la densidad de CTLA-4 en la superficie celular en comparación con aquellas células que presentan en su genoma el alelo Thr17 (Anjos, 2002). Además, se observó que este intermediario proveniente del alelo de susceptibilidad no era glicosilado en uno de los dos sitios normales de N-glicosilación de CTLA-4, siendo retro-traslocado de vuelta al citosol donde posteriormente es degradado por el proteosoma (Anjos, 2002). Por lo tanto, se postula que esta sustitución

aminoacídica sería directamente responsable de causar una disminución de CTLA-4 en la superficie del linfocito T, generando un menor control sobre su proliferación.

Según el meta-análisis realizado por el grupo de Kavvoura y colaboradores (Turpeinen, 2003), el alelo G es considerablemente más frecuente en población asiática que en población europea, pero al parecer los efectos de la presencia de este alelo no tienen relación con la ascendencia de su portador. En base a la frecuencia encontrada para este alelo en los diferentes estudios analizados, se ha calculado que el riesgo de generar DM1 aportado por este polimorfismo es de un 18% en población asiática y de un 16% en población de ascendencia europea. En base a este tipo de análisis podemos decir que nuestros resultados genéticos se acercan más a los obtenidos en población europea que a los observados en población asiática, lo cual guarda cierta concordancia con los datos de composición poblacional que indican que nuestra población esta compuesta principalmente por individuos de ascendencia caucásica.

También han sido interesantes los aportes de los estudios de base familiar. Un grupo de investigadores realizaron un análisis de desequilibrio de ligamiento para evaluar la asociación a DM1 de la región génica de CTLA-4 usando una colección multi-étnica de familias con uno o más de sus hijos afectados (Marron, 1997). El análisis TDT reveló una significativa desviación en la transmisión de alelos del microsatélite (AT)_n y del polimorfismo A+49G en familias de USA, Italia, Reino Unido, España y Cerdeña. Sin embargo, también se detectó cierta heterogeneidad en los resultados de este y otros

estudios previos en donde no se observó desviación en la transmisión del polimorfismo A+49G en población Británica y China, mientras que en población caucásica-americana los datos mostraron una débil distorsión en la transmisión alélica (Marron, 1997). En base a estos antecedentes podemos decir que nuestros resultados del análisis TDT se aproximan más a este último grupo étnico, ya que si bien se observa una tendencia de transmisión preferencial del alelo G desde los padres al caso afectado (tabla 4), esta no alcanzó niveles de significancia estadística como los obtenidos en familias europeas.

En términos generales se puede decir que la asociación entre estos polimorfismos de CTLA-4 y la susceptibilidad a la diabetes tipo 1 se mantiene en discusión hasta la fecha, dado que algunos reportes indican una fuerte asociación para tal polimorfismo en ciertas poblaciones, mientras que otros estudios desmienten tal efecto. Lo importante es conocer como tales polimorfismos afectan la función de CTLA-4, su tráfico intracelular, su proceso de oligomerización, transcripción o retención superficial a través de modificaciones post-transcripcionales.

Existen dos mecanismos conocidos por los cuales CTLA-4 ejerce su función: la competencia contra su antagonista CD28 por su ligando en común B7, o bien mediante una vía de señalización intracelular inhibitoria para la activación del linfocito T. La evidencia que sustenta este último mecanismo proviene de la observación de que la simple unión de un anticuerpo dirigido contra CTLA-4 previa activación a través del TCR y de CD28 en el linfocito T, es suficiente para inhibir su proliferación y la

producción de IL-2 (Krummel, 1996). El mecanismo preciso de señalización se desconoce. Sin embargo, se sabe que su señal regula negativamente la producción de citoquinas mediante la inhibición de los factores de transcripción AP-1, NF-kB y NFAT en el núcleo de linfocitos T activados (Fraser, 1999).

Aunque existe mucha evidencia que establece a CTLA-4 como un regulador negativo de la activación del linfocito T, también existe evidencia que sugiere una inherente plasticidad funcional de esta molécula. Esto quiere decir que CTLA-4 puede comportarse también como un regulador positivo de la activación del linfocito T dependiendo de ciertas condiciones de unión a ligando y de transducción de señales. Esta plasticidad en la función de CTLA-4 fue sugerida en el año 1992 (Linsley, 1992), sin embargo la evidencia más directa de este fenómeno fue obtenida recientemente a través del uso de un ligando sintético biespecífico llamado 24:26, que por sí solo es capaz de activar al linfocito T (Madrenas, 2004). La habilidad de este ligando de generar una señal positiva en CTLA-4 radica en la estabilización del complejo PP2A:CTLA-4 el cual es capaz de activar la vía de señalización intracelular a través del dominio Lck, a diferencia de lo que sucede con la unión del ligando B7 que gatilla la disociación de PP2A:CTLA-4 (Anexo, fig.B). La plasticidad observada en la función de CTLA-4 pone sobre el tapete un nuevo paradigma sobre cómo esta molécula regula la respuesta inmune y genera nuevas pistas para dilucidar el mecanismo a través del cual los polimorfismos del gen de CTLA-4 desarrollan la susceptibilidad observada a enfermedades de origen autoinmune.

Por otra parte, experimentos realizados en ratones KO para el gen de CTLA-4 demostraron que el efecto de desregulación homeostática y de la activación desmedida de linfocitos T en ratones deficientes de esta molécula no es independiente de la presencia de otras células. Se observó que los linfocitos T deficientes en CTLA-4 experimentaron una activación normal en presencia de linfocitos T que expresaban CTLA-4 frente a distintas situaciones de stress infeccioso (Bachmann, 1999). Estos datos sugieren que aunque CTLA-4 genere una señal inhibitoria de forma autónoma en una célula, existen factores adicionales que entran en juego, como son probablemente ciertas citoquinas generadas por linfocitos T reguladores. Si bien nuestro estudio enfocado en el ambiente inmuno-químico de la célula β se centró en la cuantificación de solo algunas citoquinas que podrían estar participando en esta patología, nuestros resultados muestran tendencias interesantes, aunque no significativas. En términos más generales no observamos diferencias importantes en la cuantificación de las citoquinas en estudio entre el grupo de diabéticos y el grupo control. Sin embargo, cuando estos datos fueron cruzados con los datos genéticos (genotipos CTLA-4), se observaron algunas tendencias que al ser analizadas en su conjunto podrían sugerir cierta asociación. De esta manera, se deduce a partir de la tabla 10 que el genotipo GG/CC concentra la mayor cantidad de citoquinas que aportan con el daño de la célula β (INF γ y TNF α , producidas por linfocitos Th1) y la menor cantidad de citoquinas que la protegen (TGF β , producida por linfocitos Th2), al compararlo con los otros genotipos. Además, los datos clínicos apoyan plenamente estos resultados evidenciando que

efectivamente los portadores de dicho genotipo presentan una diabetes más agresiva, de aparición más temprana y con mayor cantidad de episodios de cetoacidosis (tabla 12).

Desde el punto de vista de los auto-anticuerpos, nuestros resultados indican que más de la mitad de los pacientes diabéticos estudiados presentaron al menos uno de los dos anticuerpos cuantificados (GAD65 e IA-2), mientras que en el grupo control la presencia de dichos anticuerpos fue prácticamente nula. Sin embargo, hay que mencionar que estos resultados no son sorprendentes ya que se conoce hace más de 10 años que la presencia de GAD65, IA2 e IAA da como resultado aproximadamente un 75% de riesgo de asociación a DM1; mientras que la presencia de alguno de estos anticuerpos por si solo tiene un riesgo asociado cercano al 25% (Verge, 1996). Lo que si ha resultado una interesante materia de estudio corresponde a la asociación que tiene la presencia de estos anticuerpos con los genotipos específicos de CTLA-4. Según el meta-análisis de Kavvoura y colaboradores (Turpeinen, 2003), seis estudios evaluaron la relación de los genotipos de CTLA-4 con la presencia del anticuerpo GAD65 (Anexo, Fig.C), encontrándose que existe cierta asociación entre el alelo G del polimorfismo A+49G con la presencia de dicho anticuerpo (OR = 1,49). Sin embargo, los autores advierten precaución en la interpretación de tales resultados debido al amplio intervalo de confianza que generan estos datos (IC 95%: 1,05-2,13). Nuestros resultados, por su parte, apoyan esta evidencia dado que la mayor presencia del anticuerpo GAD65 se obtuvo en los pacientes con genotipo GG/CC, indicando al igual

que los datos clínicos y de cuantificación de citoquinas que este genotipo podría estar condicionando una respuesta autoinmune más agresiva.

Una posible explicación a estos resultados estaría dada por la ocurrencia de un desbalance en la proporción de linfocitos Th1 y Th2 generado probablemente por la presencia del alelo G en homocigosis, desbalance que estaría aportando e incluso siendo quizás causa principal de la destrucción de las células productoras de insulina. Si efectivamente esto es así, surge la pregunta: ¿de qué manera podría estar afectando CTLA-4 a este balance entre los linfocitos Th1 y Th2?. Existe evidencia en ratones KO para CTLA-4 que indican una mayor diferenciación hacia una respuesta Th2 (Khattri, 1999), mientras que experimentos con bloqueadores de CTLA-4 generan una polarización de linfocitos Th1 (Anderson, 2000), datos que indican que un desbalance tanto hacia una respuesta Th1 o Th2 son igualmente dañinos para la inmuno-tolerancia. También existe evidencia de que los linfocitos Th2 expresan significativamente mayores niveles de CTLA-4 comparado con los Th1 (Alegre, 1998), de lo que se puede inferir que cualquier alteración en el funcionamiento normal de CTLA-4 tendrá un efecto negativo mayor en la población Th1.

En base a los antecedentes anteriormente expuestos podemos especular que el polimorfismo A+49G podría estar afectando la correcta localización celular de CTLA-4 en la membrana de los linfocitos T, lo cual podría estar conduciendo de manera directa hacia una sobre producción de linfocitos T autoreactivos. Además, estaría influyendo

de manera indirecta al producir un desequilibrio en la proporción normal de linfocitos T reguladores, generando un aumento en la población de linfocitos Th1 cuyas citoquinas exacerbarían el daño de la célula β . Sin embargo, hay que mencionar que en este modelo no se descarta la posibilidad de que la anomalía en CTLA-4 sea producto de otro polimorfismo río abajo de la posición +49, como ha sido también sugerido (Turpeinen, 2003).

Finalmente, cabe destacar que aparte de la diabetes tipo 1 existen otras 2 enfermedades de origen autoinmune asociadas a la misma región génica que hemos estudiado: la enfermedad de Graves, generada por la presencia de autoanticuerpos contra el receptor de tirotropina llevando a una sobre-actividad de la glándula tiroide; y el Hipotiroidismo Autoinmune (AIH), enfermedad causada por una destrucción inflamatoria de los tirocitos mediada por linfocitos T, llevando a una deficiencia de la hormona de la tiroide (Ueda, 2003). De esta forma, los datos aportados por este y todos los trabajos relacionados con CTLA-4 ayudan a comprender mejor la compleja etiología reflejada en la mayoría de las enfermedades autoinmunes.

CONCLUSIÓN

El polimorfismo A+49G fue más frecuente en el grupo de los pacientes diabéticos en comparación al grupo control, lo que indica que este polimorfismo se encuentra más asociado a la diabetes tipo 1 que el polimorfismo C-318T.

Además, tal asociación pareciera tener un marcado efecto genético dosis-respuesta consistente con un modelo de codominancia, atribuyéndose al genotipo GG/CC un efecto mucho más agresivo de la enfermedad evidenciado por su asociación con una mayor presencia del anticuerpo GAD65, una mayor concentración de citoquinas pro-inflamatorias como INF- γ y TNF- α , una menor concentración de citoquinas protectoras como TGF- β , un debut de la enfermedad a más temprana edad y una mayor proporción de eventos de cetoacidosis.

Finalmente, el análisis TDT reveló la existencia de una tendencia de transmisión preferencial del alelo G desde los padres al caso afectado. Cabe mencionar que si bien este y los demás resultados no muestran significancia estadística, es probable que al aumentar el número de participantes incluyendo individuos de otras locaciones, los efectos reportados en este trabajo se tornen significativos.

ANEXO

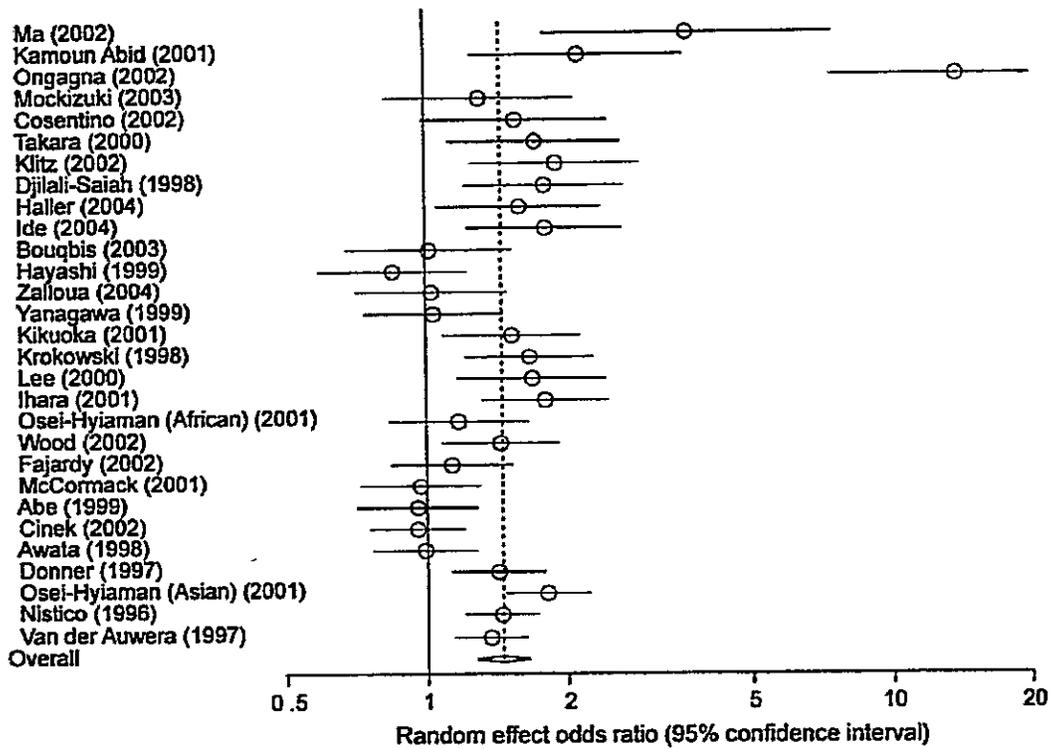


Figura A. Valores de Odds Ratio (OR) de asociación del polimorfismo A+49G con diabetes tipo 1 de 29 estudios. Los círculos indican el valor publicado. La línea horizontal sus respectivos intervalos de confianza. El rombo indica el valor de OR promedio de los 29 estudios (Kavvoura, 2005).

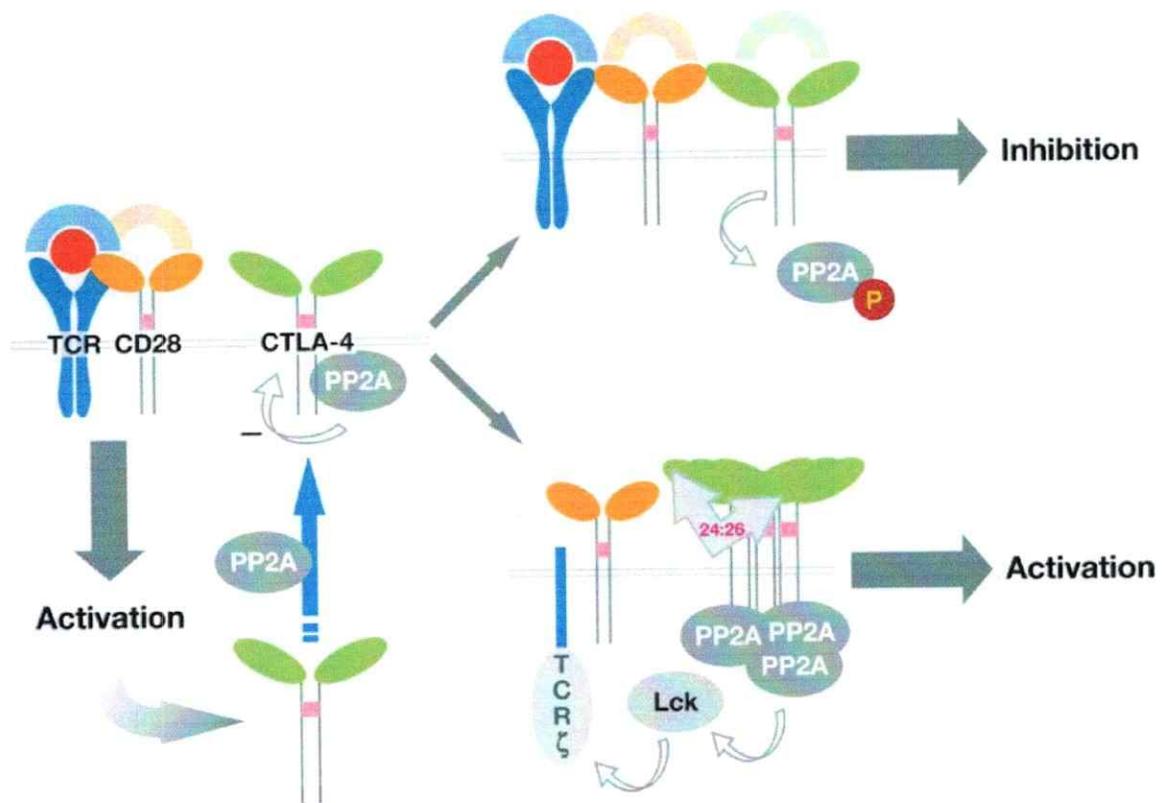


Figura B. La plasticidad en la señalización de CTLA-4 se correlaciona con su asociación a PP2A. La activación del linfocito T a través de la coligación del TCR y CD28 induce la expresión de CTLA-4. 48 hrs después de la activación, CTLA-4 se expresa en la superficie celular asociado con PP2A, bloqueando su función inhibitoria. A través de la coligación del TCR y CTLA-4, PP2A es fosforilado (círculo P) y se disocia de CTLA-4. Alternativamente, la unión de CTLA-4 con la molécula 24:26 estabiliza la unión de PP2A con CTLA-4, correlacionándose con la activación del linfocito T (Teft, 2006).

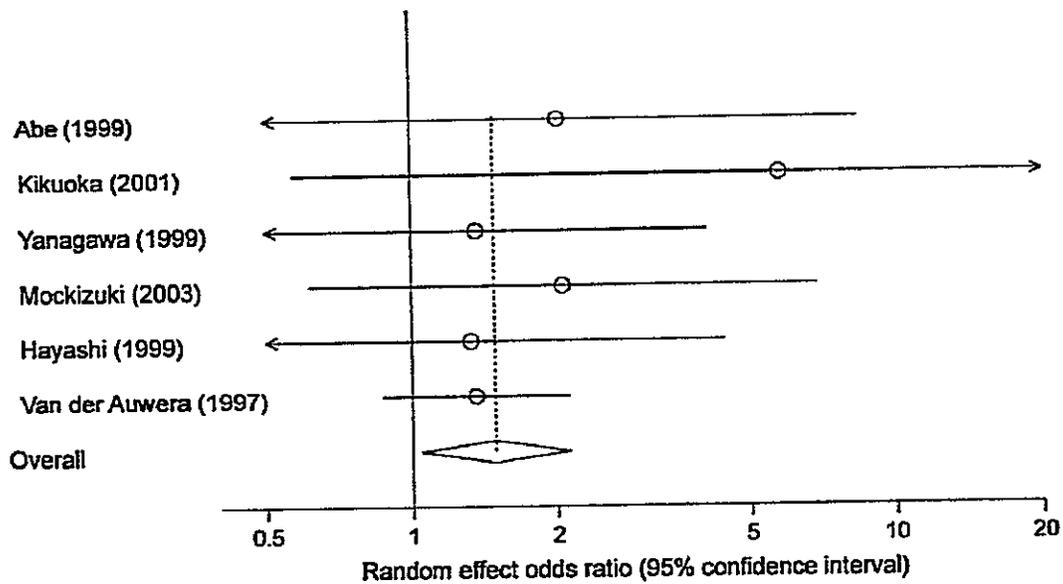


Figura C. Valores de Odds Ratio (OR) de asociación del polimorfismo A+49G con la presencia de autoanticuerpos contra la descarboxilasa 65 del ácido glutámico (GAD65) en 6 estudios. Los círculos indican el valor publicado. La línea horizontal sus respectivos intervalos de confianza. El rombo indica el valor de OR promedio de los 6 estudios con su respectivo intervalo de confianza (Kavvoura, 2005).

REFERENCIAS

1. Alegre ML, Shiels H, Thompson CB, Gajewski TF. 1998. Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 161:3347-56.
2. Anderson DE, Bieganowska KD, Bar-Or A, et al. 2000. Paradoxical inhibition of T-cell function in response to CTLA-4 blockade; heterogeneity within the human T-cell population. *Nat Med* 6:211-14.
3. Anjos S, Nguyen H, Ounissi-Benkhalha H, Tessier MC, Polychronakos C. 2002. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 result in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem* 277:46478-86.
4. Anjos S, Polychronakos C. 2004. Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes: beyond HLA. *Mol Gen and Metab* 81:187-95.
5. Atkinson MA, Maclaren NK. 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 331: 1428-1436.
6. Bach JF. 2005. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 25:74-80.
7. Bachmann MF, Gallimore A, Jones E, et al. 2001. Normal pathogen-specific immune responses mounted by CTLA-4-deficient T cells: a paradigm reconsidered. *Eur J Immunol* 31:450-58.
8. Baekkeskov S, Warnock G, Christie M, et al. 1989. Revelation of specificity of 64K autoantibody in IDDM serums by high-resolution 2-D gel electrophoresis. Unambiguous identification of 64K target antigen. *Diabetes* 38:1133-41.
9. Baroja ML, Darlington PJ, Carreno BM, Madrenas J. 2000. Inhibition of T cell activation by CTLA-4: truths and red herrings. *Mod Asp Immunobiol* 1:169-73.
10. Bell GI, Horita S, Karam JH. 1984. A polymorphic marker near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 33: 176-183.
11. Bennett ST, Lucassen AM, Gough SC, Powell EE, Undlien DE, Pritchard LE, Merriman ME, Kawaguchi Y, Dronsfield MJ, Pocicot F, et al. 1995. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 9:284-92.

12. Bennett ST, Wilson AJ, Cucca F, Nerup J, Pociot F, Mckinney PA, Barnett AH, Bain SC, Todd JA. 1996. IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene-linked minisatellite locus. *J Autoimmun* 9:415-21.
13. Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW. 2003. Diabetes Antibody Standardization Program: first assay proficiency evaluation. *Diabetes* 52:1128-36.
14. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. 2004. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* 36:337-8.
15. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, et al. 1987. A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. *Nature* 328:267-70.
16. Cardon LR, Palmer LJ. 2003. Population stratification and spurious allelic association. *Lancet* 361:598-604.
17. Carrasco E, Pérez-Bravo F, Santos JL, et al. 1996. One of the lowest validated incidence rates of insulin dependent diabetes mellitus in the Americas: Santiago, Chile. *Diab Res Clin Pract* 34:153-7.
18. Carreno BM, Collins M. 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for co stimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:29-53.
19. Chentoufi AA, Polychronakos C. 2002. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: The mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes* 51:1383-90.
20. Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP. 1988. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol* 18:1901-5.
21. Decochez K, Tits J, Coolens JL. 2000. High frequency of persisting or increasing islet-specific autoantibody levels after diagnosis of type 1 diabetes presenting before 40 years of age. *Diabetes Care* 23:838-44.
22. Deichmann K, Heinzmann A, Bruggenolte E, et al. 1996. An Mse I RFLP in the human CTLA-4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 225:817-18.
23. Devendra D, Eisenbarth GS. 2003. Immunologic endocrine disorders. *J Allergy Clin Immunol* 111:624-36.

24. Finn PW, He H, Wang Y, Wang Z, Guan G, et al. 1997. Synergistic induction of CTLA-4 expression by co stimulation with TCR plus CD28 signals mediated by increased transcription and messenger ribonucleic acid stability. *J Immunol* 158:4074-81.
25. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. 1991. Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man. *J Pathol* 165:97-103.
26. Fraser JH, Rincon M, McCoy KD, Le Gros G. 1999. CTLA-4 ligation attenuates AP-1, NFAT and NF-kB activity in activated T cells. *Eur J Immunol* 29:838-44.
27. Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA, et al. 1993. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262:909-11.
28. Gale EA. 2002. A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia* 45:588-94.
29. Gale EA. 2002. The rise of childhood type 1 diabetes in the twentieth century. *Diabetes* 51:3353-61.
30. García M, Durruty P. 2003. Diabetes Mellitus. Clasificación, Diagnóstico y Pesquisa de la Diabetes Mellitus, Epidemiología de la Diabetes Mellitus, Etiopatogenia de la Diabetes Mellitus pp 23-55. *Arancibia Hnos. y Cía. Ltda.*
31. Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, et al. 2004. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of highrisk HLA haplotypes. *Lancet* 364: 1699-700.
32. Gorus FK, Goubert P, Semakula C, et al. 1997. IA-2-autoantibodies complement GAD 65 autoantibodies in new onset IDDM patients and help predict impending diabetes in their siblings. *Diabetologia* 40:95-9.
33. Harper K, Balzano C, Rouvier E, et al. 1996. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 147:1037-44.
34. Hawa MI, Beyan H, Buckley LR, Graham RD. 2002. Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes. *Am J Med Genet* 115: 8-17.

35. Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL, et al. 2000. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 49:1319-24.
36. Hyoty H. 2002. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann Med* 34:138-47.
37. Jago CB, Yates J, Camara NO, Lechler RI, Lombardi G. 2004. Differential expression of CTLA-4 among T cell subsets. *Clin Exp Immunol* 136:463-71.
38. Karvonen M, Pitkaniemi J, Tuomilehto J. 1999. The onset age of type 1 diabetes in Finnish children has become younger. *Diabetes Care* 22:1066-70.
39. Kaevonen M, Tuomilehto J, Libman I, et al. 1993. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36:883-92.
40. Kavvoura F, Loannidis J. 2005. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 162:3-16.
41. Kawasaki E, Abiru N, Eguchi K. 2004. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of β cell damage. *Diab Res and Clin Pract* 66:27-32.
42. Khattri R, Auger JA, Griffin MD, Sharpe AH, Bluestone JA. 1999. Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. *J Immunol* 162:5784-91.
43. Kouki T, Gardine CA, Yanagawa T, et al. 2002. Relation of three polymorphism of the CTLA-4 gene in patients with Graves disease. *J Endocrinol Invest* 25:208-13.
44. Krummel MF, Allison JP. 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 183: 2533-40.
45. Larrenas G, Montecinos A, Manosalva M, et al. 1996. Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in the IX Region of Chile: ethnic differences. *Diab Res Clin Pract* 34:147-51.
46. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734-6.
47. Lee KM, Chuang F, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zang W, et al. 1998. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282:2263-6.

48. Lee YJ, Lo FS, Shu SG, Wang CH, Huang CY, et al. 2001. The promoter region of the CTLA4 gene is associated with type 1 diabetes mellitus. *J of Pediatric Endo Met* 14:383.
49. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gribson MG. 1992. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA-4Ig. *Science* 257:789-92.
50. Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, Rhee L, Gray G, Nabavi N, et al. 1995. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 181:1145-55.
51. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Sharpe AH, Gray GS, Collins M. 1999. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA-4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics* 60:341-55.
52. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. 1990. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1 *Proc Natl Acad Sci* 87:5031-35.
53. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, et al. 1992. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 176:1595-604.
54. Linsley PS, Nadler SG, Bajorath J, Peach R, Leung HT, et al. 1995. Binding stoichiometry of the cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 (CTLA-4). A disulfide-linked homodimer binds two CD86 molecules. *J Biol Chem* 270:15417-24.
55. Loweth AC, Williams GT, James RF, Scarpello JH, Morgan NG. 1998. Human islets of Langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1_β and Fas ligation. *Diabetes* 47:727-732.
56. Luhder E, Hoglund P, Allison JP, Benoist C, Mathis D. 1998. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med* 187:427-32.
57. Madrenas J, Chau LA, Teft WA, Wu PW, Jussif J, et al. 2004. Conversion of CTLA-4 from inhibitor to activator of T cells with a bispecific tandem single-chain Fv ligand. *J Immunol* 172:5948-56.

80. Vaidya B, Pearce S. 2004. The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. *Euro J of Endo* 150:619-26.
81. van der Merwe PA, Davis SJ. 2003. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 21:659-84.
82. Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, et al. 1996. Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45:926-33.
83. Viskary H, Ludvigsson J, Uibo R, et al. 2005. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and maternal enterovirus antibodies: time trends and geographical variation. *Diabetologia* 48:1280-7.
84. Vyse Tj, Todd JA. 1996. Genetic analysis of autoimmune disease. *Cell* 85: 311-318.
85. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-13.
86. Wang XB, Zhao X, Giscombe R, Lefvert AK. 2002. A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes Immun* 3:233-4.
87. Waterhause P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 270:985-8.
88. Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, et al. 1999. Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes* 48:460-8.