



**“INTERACCION ENTRE LOS POLIMORFISMOS ASOCIADOS
AL LINFOCITO T CITOTOXICO (CTLA-4) Y RECEPTOR DE
MUERTE CELULAR PROGRAMADA 1 (PD-1) EN DIABETICOS
TIPO 1: MODULACION DE LA RESPUESTA INMUNO-
REGULADORA NEGATIVA DE LAS CELULAS T”**

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

SYLVIA EDITH FLORES RUBILAR

Dr. Francisco Pérez-Bravo
Director Seminario de Título

Dra. Madeleine Lambrot
Co-Directora

Comisión de Evaluación de Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono
Presidente Comisión

Dr. Marcelo Baeza
Corrector

Santiago de Chile, Marzo de 2009



Nací en la hermosa ciudad de Arica. Luego, a los cinco años llegue con mi familia a Santiago, donde comencé mis estudios hasta el día de hoy. Ingrese a la Universidad de Chile en el 1999 a la carrera de Licenciatura en Biología, pero al tiempo me di cuenta de que otros intereses se fueron desarrollando a medida que crecían mis conocimientos. Entonces, decidí cambiarme a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, la cual es una carrera innovadora y versátil. En un principio, estudiaba con mucho entusiasmo, pero luego pasaron cosas en mi vida que afectaron de gran manera el ámbito académico. Pero, estoy aquí en el año 2009, terminando con mucho esfuerzo lo que un día decidí para mi vida, transformándome en una mujer muy trabajadora y responsable. Por lo mismo, seguiré perfeccionándome, porque con el tiempo aprendí que soy capaz de realizar y de crear muchas más cosas de lo que en algún momento pensé.

Agradecimientos.

Al finalizar esta Tesis de Pregrado quiero agradecer a todas las personas que me acompañaron en su realización, especialmente:

A mis padres, Gilberto Flores y Camila Rubilar, por estar en todos los momentos buenos y malos de mi vida. Les agradezco su apoyo y comprensión. Simplemente puedo decir que son los mejores padres que podría tener.

A mis hermanos, Cristian y Edgardo, por la ayuda y cariño que me brindan día a día.

A mi novio, Jorge, por su paciencia y buenos consejos que ayudaron a que yo siguiera dando la pelea y ser lo que soy ahora. Te amo mucho.

A mis amigas, en especial, Amaya y Alejandra, por alegrar mis días y acompañarme en momentos tan importantes de mi vida. Las admiro por ser esforzadas e inteligentes. Las quiero mucho.

A mis compañeros de Laboratorio, por haber sido los primeros que me acogieron en el INTA.

A María Elena Ponce, por su excelente disposición y ayuda en el laboratorio.

Y por último, mi director de tesis, Dr. Francisco Pérez-Bravo, le agradezco su confianza, paciencia, constante apoyo en mi formación como investigadora. Es un gran investigador, es un privilegio trabajar junto a Ud. Gracias por creer en mí.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv

CONTENIDOS

1 Antecedentes Generales	1
1.1 Diabetes Mellitus Tipo 1	3
2. Epidemiología de la Diabetes Mellitus Tipo 1	5
2.1 Factores Ambientales	7
2.2 Factores Genéticos	11
2.3 Receptor de muerte programada (PD-1)	14
2.4 Estudios de asociación PD-1 y enfermedades autoinmune	16
2.5 CTLA-4	17
2.6 Polimorfismos en CTLA-4: Enfermedades autoinmunes y DM1	18

2.7 Antecedentes Serológicos de DM1	20
Hipotesis	23
Objetivo General	23
Objetivo Especificos	23
3.1 Participantes del Estudio	24
3.2 Diseño de Estudio	24
3.3 Extracción de DNA	25
3.4 Genotipificacion	26
3.5 Análisis Serológico	28
3.6 Análisis Estadístico	28
4.1 Características clínicas de los grupos de estudio	30
4.2 Genotificacion	31
4.3 Analisis Serologico	33
4.4 Análisis Genetico	34
DISCUSION	41
CONCLUSION	46
REFERENCIAS	47
ANEXO	56

Tablas.

Tabla 1: Método PCR-RFLP, partidores PCR y enzimas de restricción (RE)	26
Tabla 2: Características clínicas e inmunológicas de ambos grupos de estudio	30
Tabla 3: Frecuencia genotípica y alelica en el estudio caso-control para la variante +49 A>G del gen <i>CTLA-4</i>	34
Tabla 4: Frecuencia genotípica y alelica en el estudio caso-control para la variante PD 1.2 del gen <i>PDCD-1</i>	35
Tabla 5: Frecuencia genotípica y alelica en el estudio caso-control para la variante PD 1.5 del gen <i>PDCD-1</i>	36
Tabla 6: Frecuencia genotípica y alelica en el estudio caso-control para la variante PD 1.6 del gen <i>PDCD-1</i>	36
Tabla 7: Frecuencia genotípica y alelica en el estudio caso-control para la variante PD 1.9 del gen <i>PDCD-1</i>	37
Tabla 8: Frecuencias haplotípicas relevantes entre casos y controles para los polimorfismos PD 1.2; PD 1.5; PD 1.6 y PD 1.9 del gen de <i>PDCD-1</i>	38
Tabla 9: Combinación genotípica para los polimorfismos de <i>PD-1</i> en pacientes diabéticos y controles	39
Tabla 10: Combinación genotípica de los polimorfismos de <i>PD-1</i> según genotipos de la variante +49A>G de <i>CTLA-4</i> portadoras del alelo G en pacientes diabéticos y controles	40

Figuras.

Figura 1: Factores relevantes involucrados en el desarrollo de respuesta auto-inmune	4
Figura 2: Papel regulador de PD-1 y su ligando en la proliferación	15
Figura 3: Polimorfismos encontrados en las proximidades del gen de <i>CTLA-4</i>	19
Figura 4: Mecanismos de destrucción de la célula β en la diabetes tipo 1	21
Figura 5: Fotografía de un gel de agarosa con productos de cortes de distintas muestras como ejemplo de los polimorfismos A (PD 1.2) y B (PD 1.9) estudiados	27

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A	Adenina
Ala	Alanina
ADA	Asociación Americana de Diabetes
BB	Biobreding
B7	Molécula coestimuladora
C	Citosina
CEDINTA	Centro de Diagnostico del INTA
CMV	Citomegalovirus
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
CTLA-4	Antígeno 4 Asociado al Linfocito T Citotóxico
ELISA	Inmuno Ensayo Enzimático de detección
DAISY	Autoinmunidad diabética en la juventud
DIPP	Predicción y Prevención de la diabetes
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DNA	Acido Desoxirribonucleico

dNTP	Di Nucleótido Trifosfato
G	Guanina
GAD65	Acido Glutámico Descarboxilasa
HLA	Antígeno del Leucocito Humano
IAA	Anticuerpo Anti Insulina
IA-2	Proteína Tirosina Fosfatasa
ICA	Anticuerpos contra Células de los islotes pancreáticos
IFN-γ	Interferón Gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleuquina
IDDM	Diabetes Mellitus Insulino Dependiente
INS	Insulina
KO	Knock out
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
LYP	Proteína Tirosina Fosfatasa
MLS	“Maximum Lod Score”

MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
NOD	Diabético No Obeso
mRNA	RNA mensajero
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	“Odds Ratio”
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Programmed Death 1
PDCD-1	Programmed Cell Death 1
PD-L	Ligando PD
PTPN₂₂	Proteína Tirosina Fosfatasa N22
RA	Artritis Reumatoide
RE	Enzimas de Restricción
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
T	Timina
Th	Linfocito T Cooperador

Thr	Treonina
TCR	Receptor de Linfocitos T
TGF-α	Factor de Crecimiento Transformador Alfa
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformador Beta
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
TRIGR	Estudio para reducir la DM1 en población de riesgo
VNTR	Repetidos en Tándem en Número Variable

RESUMEN.

Introducción: La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), es una enfermedad de cuya incidencia se encuentra en aumento en todo el mundo y que presenta características autoinmunes que involucra factores genéticos y ambientales. Diversos factores genéticos han sido involucrados y en particular en los receptores de muerte celular programada (PD-1) y CTLA-4 reconocidos como elementos cruciales en la regulación negativa en la tolerancia periférica. Recientemente se ha demostrado que polimorfismos en zonas reguladoras del gen *pdcd-1* se asocian con fuerte susceptibilidad a patologías autoinmunes.

Objetivo: Explorar la contribución del gen *pdcd-1* en la DM1 y su posible interacción con otro polimorfismo asociado a la inmuno regulación negativa de las células T como *CTLA-4*.

Pacientes y métodos: Se incorporaron 160 casos incidentes con DM1 y 160 niños controles, comparables en edad y género. Se realizó estudio genético para la variante +49A>G del gen *ctla-4* y cuatro variantes genéticas para el receptor *PD-1* mediante PCR y RFLP. Se cuantifico la molécula de CTLA-4 soluble mediante ELISA. El análisis de haplotipos se realizó mediante programa SHEsis.

Resultados: Nuestro estudio mostró que los polimorfismos PD 1.5 y PD 1.6 tienen una asociación cruda mayor que los polimorfismos PD 1.2, PD 1.9 y +49A>G con la DM1 al compararlos en forma individual. Sin embargo, en el análisis de haplotipos PD-1, la incorporación del polimorfismo CTLA-4 (Alelo A o Alelo G), modifica el OR en forma notoria: AG CT AG TT aumenta su asociación de OR = 2,5 a OR= 3,125 y la combinación GG CT AG CT modifica su asociación con DM1 de un OR = 2.7 a OR= 3,333.

Conclusión: Nuestros datos son la primera evidencia de interacción entre dos polimorfismos asociados a la regulación negativa en la DM1, mostrando un fuerte papel regulador del alelo G de *CTLA-4* sobre las variantes *PD-1*.

Abstract

Introduction: Type 1 diabetes mellitus (T1D) is a disease with a progressive increase around the World and show characteristic of autoimmune disease that involves genetic and environmental factors. Several genetic factors has been involved and I particular the programmed death cell receptors (PD-1) and CTLA-4, recognized has crucial molecules in the negative tolerance. Recently, has been shown that the polymorphisms in regulatory zones of the *pdccl-1* gene have been associated with susceptibility to autoimmune diseases.

Aim: To explore the contribution of the *pdccl-1* gene in T1D and their possible interaction with another negative T cell regulator as *CTLA-4*.

Patients and Methods: We incorporated 160 incident cases of T1D and 160 healthy control children, matched by age and sex. The genetic study was done to +49A>G genetic variant of *CTLA-4* and four genetic variants of *PD-1* by means of PCR and RFLP analysis. We quantified the serum levels of soluble CTLA-4 protein by ELISA. The haplotypes analysis was done by means of the SHEsis software.

Results: Our study shown that the *PD 1.5* and *PD 1.6* polymorphisms have a higher crude association with T1D compared to *PD 1.2*, *PD 1.9* and +49A>G. However, in the PD-1 haplotypes analysis, the addition of the CTLA-4

polymorphisms (A allele or G Allele) modified in relevant form the OR: AG CT AG TT increased the association from OR = 2.5 to OR= 3.125 and the combination GG CT AG CT modified the association with T1D from OR = 2.7 to OR= 3.333.

Conclusion: Our data is the first evidence of interaction between two negative regulation polymorphisms in T1D, showed a strong regulator role of the G allele in *CTLA-4* over the *PD-1* variants.

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 (1).

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 (2). 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 (2).

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 (2).

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 (1). 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 (1).

1.1 Diabetes Mellitus Tipo 1.

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1), también conocida como diabetes juvenil, 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 infantiles.

Su etiología es extremadamente compleja, donde intervienen factores ambientales que interactúan 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 (3). Dentro de estos factores ambientales figuran infecciones virales (4,5) toxinas y dieta (6), entre otros, conduciendo de alguna manera aún desconocida a la ruptura de la tolerancia autogénica normal (Fig.1)

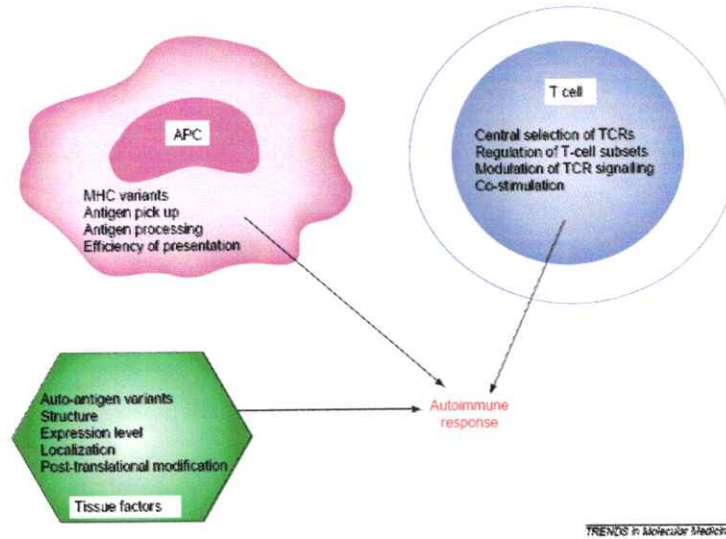


Figura 1. Factores relevantes involucrados en el desarrollo de respuesta auto-inmune (7).

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, mas conocido como Sistema HLA. Se ha determinado que cerca de un 95% de las personas que padecen de DM1 presentan una alta frecuencia de los alelos DR3 o DR4, siendo particularmente sensibles aquellas que presentan ambos alelos (8). 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 (9).

2. Epidemiología de la Diabetes Mellitus Tipo 1.

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 (10).

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 2,36/100.000 habitantes/año en el periodo 1986-1992 a cifras cercanas a los 4,02/100.000 hab/año entre 1993-2003 (12).

La incidencia de DM1 en diferentes grupos étnicos y países es extremadamente variable, donde el componente genético y ambiental participa activamente. Una alta tasa de incidencia, ha sido observada en países nórdicos como Suecia,

Dinamarca, Noruega, Finlandia e Italia. De manera opuesta, los países asiáticos de regiones como China y Korea, son los que presentan menores tasas de afectados.

En países de América, existe una gran heterogeneidad étnica en su población. Por ejemplo, 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, la incidencia de la DM1 es variable, ya que existe gran heterogeneidad étnica en su población. Se estima que nuestra población tiene aproximadamente un 60% de ascendencia europea, 33% amerindia y 7% africana. Se ha reportado que en la población de la IX Región la tasa de incidencia es significativamente menor en niños mapuches (0,43/100.000 hab/año) (11) comparados con niños de la Región Metropolitana de Santiago (2.36/100.000 hab/año).

La diferencia en la tasa de incidencia de DM1 en la población chilena representaría un balance entre la pertenencia étnica (población Caucásica y Amerindia) y la diferente frecuencia de alelos HLA. Además, existen una variedad de factores ambientales que están involucrados en la incidencia de diabetes en el mundo. De esta manera se han considerado 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 (1).

Esta característica epidemiológica es también aplicable a nuestro país y el Registro de Incidencia de Santiago así lo demuestra, encontrándose una alta frecuencia de la enfermedad en comunas de ingresos económicos altos, con mayor componente caucásico y con un moderado cambio en el patrón de debut, apareciendo casos menores de 4 años y lactantes (19,20).

2.1. Factores Ambientales.

En los últimos años se ha producido un aumento importante de las cifras de incidencia de DM1. Dicho incremento ha sido demasiado acelerado para ser explicado solo por factores genéticos, adquiriendo más importancia los factores ambientales en todas las poblaciones estudiadas. La identificación de estos factores es de gran relevancia, ya que pueden contribuir al entendimiento de la enfermedad. Por esta razón, se han logrado identificar múltiples factores, entre los cuales destacan las infecciones virales, los factores dietéticos y los tóxicos ambientales. También, han adquirido especial importancia factores perinatales y gestacionales debido a que cada vez es más precoz el diagnóstico de DM1.

A pesar de lo difícil de este escenario, se han logrado identificar varios candidatos ambientales, dentro de los cuales siguen siendo los más citados 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 (5,12). 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 (13). Este hecho supone que 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”) (26). 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 (14).

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) y el ratón diabético no obeso (NOD) (22). 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 (6). 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 (15).

Desde el punto de vista nutricional, experimentos con ratas BB (susceptibles a la DM1) han demostrado que una dieta rica en albúmina aumenta la incidencia de DM1. 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 (16).

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 (17). También se encontraron fuentes de aminoácidos que cumplían un efecto retardante en el desarrollo de la DM1, destacándose el efecto que produce una dieta basada en caseína hidrolizada. Sin embargo, aún no está claro si esta protección es debida realmente a factores retardantes de la diabetes o simplemente se debe a la carencia de factores gatillantes (17).

Existe una amplia evidencia donde se señala que la variabilidad estacional estaría relacionada con la incidencia de DM1 en 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 (1). 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 (18).

Además, se registran factores perinatales y gestacionales como infecciones por enterovirus durante la gestación, ganancia extrema de peso de la madre o incompatibilidad de grupo sanguíneo e incluso se discute sobre factores psicológicos como el estrés. Aparte de estos factores, existe evidencia de otros eventos 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 más frecuente, mientras que en niños obesos el riesgo aumenta entre un 20-30%. (1)

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 sí sólo ponga en marcha el proceso

autodestructivo de la célula β , dejando en evidencia 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 DM1 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 (26-29).

2.2. 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 (3). Estudios realizados en gemelos homocigóticos diabéticos demostraron que existe hasta un 50% de concordancia para que ambos presenten DM1 (30). 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 (31). Resultados que

demuestran claramente la participación de un componente de carácter hereditario en la etiología de la DM1. Para identificación del componente de carácter hereditario se ha llevado a cabo una serie de estudios 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 (32,33).

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. Desde 1992 a la fecha, se han propuesto varios modelos para explicar este fenómeno de susceptibilidades basadas en la molécula MHC clase II cuya estructura terciaria favorecería la presentación de autoantígenos a los linfocitos T, desarrollando una respuesta autoinmune (3, 9, 31-33). Sin embargo, a pesar de ser uno de los marcadores más fuertes en DM1, no ha permitido explicar el fenómeno de susceptibilidad en muchos países y grupos étnicos (34).

Dentro de los llamados genes “no HLA” existe un número considerable de genes candidatos, cada cual haciendo un aporte más bien limitado de la susceptibilidad genética a la DM1 (3, 33). Entre ellos destacan: el locus *IDDM2* en el cromosoma 11p15, con polimorfismos de secuencias repetidas en tandem de número variable, localizado en el gen de insulina (*INS VNTR*). 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. 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 auto reactivos insulino-específicos debido a una pobre selección autogénica en el timo (35), hipótesis que aún no ha sido demostrada.

Finalmente otro locus de importancia, es la región *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 (36,37). 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.

Actualmente, la investigación en genes candidatos está dirigida hacia el descubrimiento de nuevas regiones génicas de susceptibilidad a DM1. En este sentido, se han identificado dos regiones que están siendo objeto de variados estudios poblacionales. La variante PTPN₂₂ del gen que codifica para la Proteína Tirosina-Fosfatasa (*LYP*) como nuevo factor de susceptibilidad a DM1 actuando también a través de la regulación de la respuesta del linfocito T (38,39). Por último, trabajos de los últimos 5 años también han resaltado el papel de los receptores de muerte programada 1 (programmed death 1, *PD-1*) como muy relevantes en el reconocimiento de estructuras que regulan negativamente la relación entre la célula presentadora del antígeno (APC) y el linfocito T respectivamente.

2.3 Receptor de muerte programada (*PD-1*).

Las moléculas de muerte celular programada (*PD-1*) pertenecen a la familia de receptores CD28 y son expresadas en las células activadas T, B y mieloides (40). Se ha postulado que *PD-1* juega un importante rol en la inducción y/o mantención de la

tolerancia periférica. Por medio de la interacción con sus ligandos (PDL1 y PDL2), PD-1 inhibe la estimulación antigénica de las células T y B. Los ligandos PD-Ls pertenecen a la familia B7 y pueden ser expresados tanto en órganos linfoides, como no linfoides. El balance de estas señales inhibitorias (PD-1 y CTLA-4) y de estimulación (B7) provee a las interacciones en la superficie celular de los linfocitos T y células presentadoras de antígenos de los mecanismos cruciales de la homeostasis celular para el mantenimiento de la tolerancia periférica (41). La disrupción de este delicado balance puede conducir al quiebre de la auto-tolerancia y por lo tanto generar un desbalance conducente a la patogénesis de las enfermedades autoinmunes (Fig. 2).

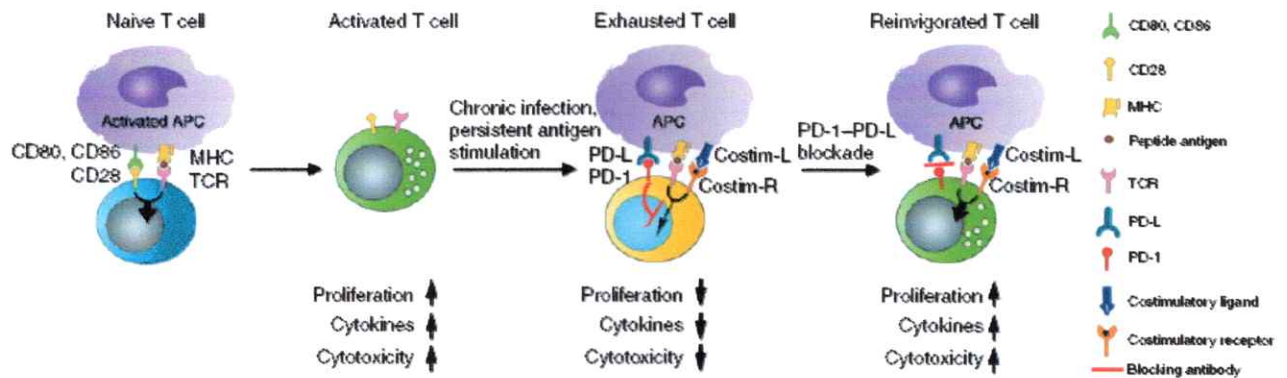


Figura 2. Papel regulador de PD-1 y su ligando en la proliferación (41).

La función de PD-1 como un regulador de la tolerancia periférica fue inicialmente apoyada por la observación que indicaba que los modelos animales deficientes en PD-1 desarrollaban enfermedades autoinmunes, a pesar de tener distintos fenotipos o diferente “background” genético (42). De esta forma, ratas C57BL6 PD-1^{-/-} mostraron el desarrollo espontáneo de un síndrome similar al Lupus que incluía glomerulonefritis y artritis destructiva. Ratones BALB/c deficientes en PD-1

mostraron desarrollo de cardiomiopatía dilatada la cual parecía estar mediada por autoanticuerpos contra proteínas cardíacas y depósitos de IgG en los cardiomiocitos (43,44). Estos hallazgos apoyan la idea de que PD-1 puede suprimir la activación inmune y prevenir la aparición de autoinmunidad. El gen humano para PD-1 (*pdccl1*) está localizado en el cromosoma 2q37. Se han identificado varios polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) para el gen *PDCDI* y se han descrito diversas asociaciones con desórdenes autoinmunes tales como: Lupus Eritematoso (LES), artritis reumatoide, tiroiditis y diabetes tipo 1 entre otras (45).

2.4. Estudios de asociación PD-1 y enfermedad autoinmune.

Los diversos polimorfismos del gen *PD-1* han sido asociados a patologías específicas relacionadas con la autoinmunidad (46,47). En el caso de Lupus Eritematoso Sistémico (LES), los estudios realizados en Suecia muestran asociación del polimorfismo PD 1.3 con manifestaciones renales del LES (48). También se ha descrito asociación en población China (49). Estudios en Taiwán muestran una asociación positiva (50) y otra negativa para LES (51). Este fenómeno también se observa en una cohorte poblacional multiétnica conformada por caucásicos, asiáticos, hispano y afroamericanos en USA (52) y en un estudio multipoblacional europeo (53), efecto similar se ha observado en población mexicana (54). El estudio realizado en población española, muestra resultados contradictorios (55,56). En artritis reumatoide (RA) los hallazgos son similares en cuanto a asociación positiva tanto en población de Taiwán (57), y negativa en japoneses (58). Otras asociaciones descritas

para estos polimorfismos son: con Espondilitis Anquilosante en coreanos (59), Encefalomiелitis autoinmune (60), enfermedad hepática autoinmune (61,62), Cirrosis biliar (63). Recientemente, la presencia del alelo A para el SNPs PD-1.6 ha sido asociado a la presencia de pénfigo en población brasileña con ancestro europeo (64). Los estudios realizados en modelos animales con DM1 también muestran buena asociación. En ratones NOD el polimorfismo en *PD-1* y su ligando PD-L1 se asocian con diabetes autoinmune (65), fenómeno confirmado también por Fife y cols en el año 2006 (44). El modelo “knock out” PD-1^{-/-} muestra una fuerte polarización hacia la respuesta Th1, autoinmunidad acelerada e infiltración de islotes (66-68). Estudios en pacientes con DM1 muestran resultados negativos en población francesa (69), datos controversiales (70) y otros que sugieren un papel positivo de PD-1 con susceptibilidad a diabetes tipo 1 en población Danesa (71) y Japonesa (72,73).

2.5. CTLA-4.

El gen antígeno 4 asociado a linfocito T Citotóxico (*CTLA-4*) se localiza en el cromosoma 2q33 y codifica para molécula coestimuladora que se expresa en la superficie de la célula T (74). CTLA-4 junto con CD28 juegan un rol esencial en la respuesta de la célula T frente al antígeno (37,74). La activación de la célula T se inicia con el reconocimiento entre su receptor (TCR) y las moléculas MHC de clase II, sin embargo, la activación completa conducente a la proliferación de células T y la activación de citoquinas, solo se produce con esta segunda señal de coestimulación (CTLA-4). En ausencia de esta segunda señal, la unión de TCR-

HLA clase II se hace más débil generando efectos refractarios en la célula, tales como anergia clonal o apoptosis. En estado quiescente, la mayoría de las moléculas CTLA-4 están almacenadas en vesículas intracelulares. Después de la activación de TCR, estas vesículas se movilizan a la superficie celular, aumentando su expresión y compitiendo con CD28 por los sitios de unión a la molécula B7 (74).

2.6 Polimorfismos en *CTLA-4*: Enfermedades autoinmunes y DM1.

El gen *CTLA-4* ha sido propuesto desde hace varios años como un gen candidato en diversas enfermedades autoinmunes (75-77), entre ellas la diabetes tipo 1, dado su papel gravitante en la respuesta proliferativa de células T (37, 74, 77). Este gen, denominado *IDDM12* ha sido asociado a DM1 en diversos países como España, Italia, Alemania y Bélgica (79-80). No obstante, hay una serie de publicaciones en población japonesa, del Reino Unido y USA que no muestran el mismo grado de asociación (81, 82). Para el gen de *CTLA-4* se han descrito diversos polimorfismos en distintas zonas de su región codificante o a nivel de promotor (Fig. 3) (83).

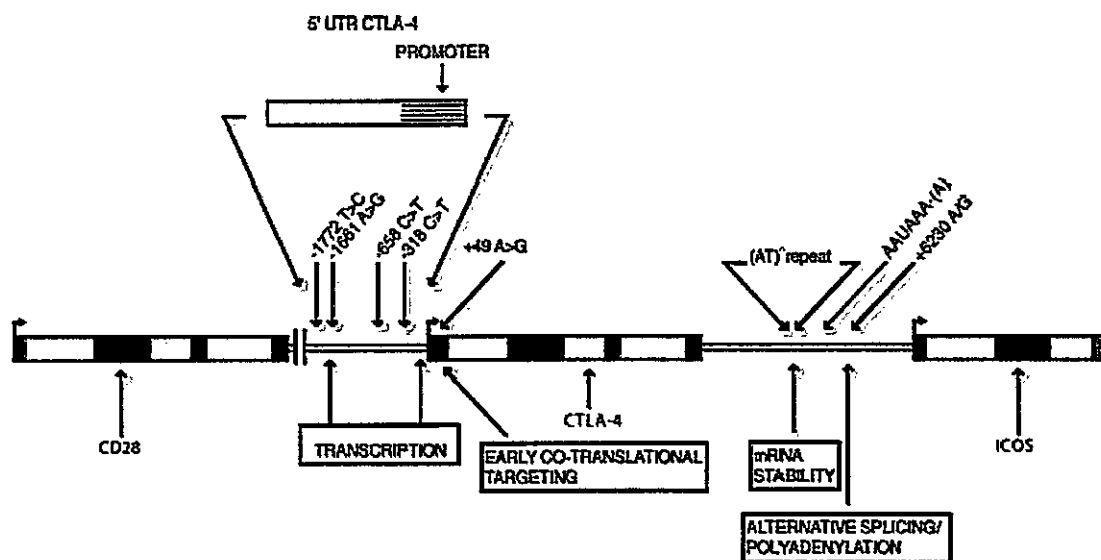


Figura 3. Polimorfismos encontrados en las proximidades del gen de *CTLA-4*: Existen múltiples polimorfismos que flanquean la región génica de *CTLA-4*. Nuestro estudio se centró en el polimorfismo C-318T ubicado en la región promotora del gen y en el A+49G, único polimorfismo encontrado en una región codificante del gen de *CTLA-4* (exón 1) (84).

Dentro de esta amplia gama de polimorfismos, uno de los mejores documentados corresponde a la variante +49 A/G, sustitución que genera un cambio aminoacídico de Thr17Ala en el péptido señal de la molécula (83). Se ha demostrado que la presencia de esta variante genética en *CTLA-4* produce una glucosilación incompleta a nivel de Ala17, conduciendo a un transporte anómalo a nivel de retículo endoplasmático, lo anterior repercute en la obtención de una molécula CTLA-4 (Ala17) menos madura en la superficie celular, lo cual podría explicar en parte, la menor función inhibitoria de CTLA-4 en los individuos portadores de este polimorfismo (37). Por otra parte, otro de los polimorfismos que ha demostrado un buen grado de asociación con diabetes tipo 1 corresponde a la variante +6230 G/A

en la región 3' que afectaría la estabilidad del RNA mensajero de CTLA-4. Otra variante descrita más recientemente corresponde a la mutación -318 C/T que se encuentra en la próxima al polimorfismo +49 A/G en el promotor del gen.

2.7 Antecedentes Serológicos de DM1.

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 (7, 21, 22). 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 (21,22). 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 (23). 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 . 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 (21) (Fig.4).

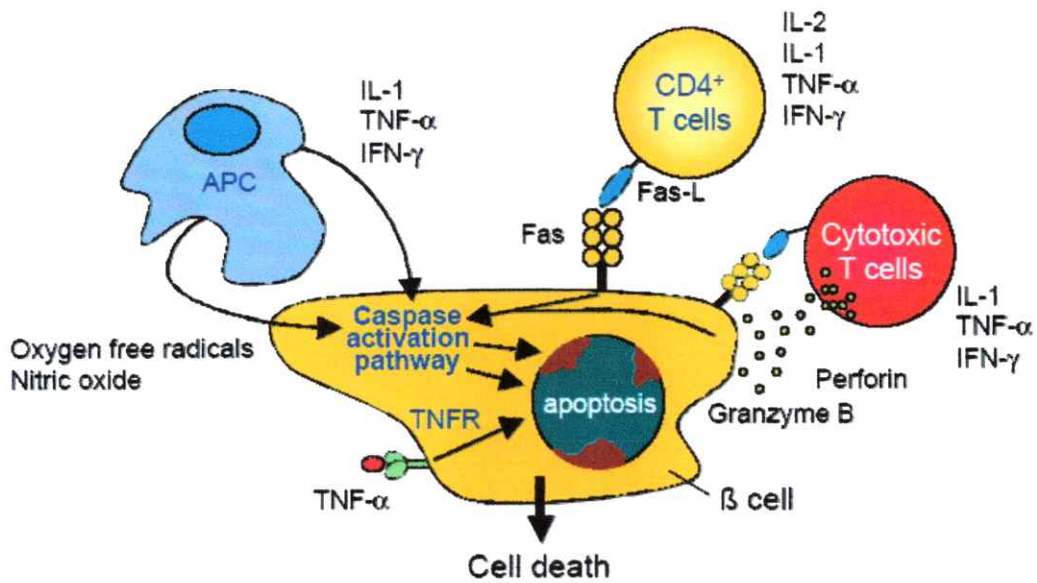


Figura 4. Mecanismos de destrucción de la célula β en la diabetes tipo 1. (21)

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), una proteína Tirosina-fosfatasa (IA-2) y la insulina (IAA). 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 (24). 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

mayor persistencia del anticuerpo GAD-65 (24). Sin embargo, a pesar de que estos auto-anticuerpos se encuentran en un alto porcentaje de los pacientes diabéticos recién diagnosticados, existe un porcentaje no despreciable (del 22% hasta el 40%) de pacientes que no presentan un patrón positivo de autoinmunidad al debut (25), lo cual muestra la complejidad de la patología aproximándola a la presencia de fenómenos apoptóticos en su inicio (21).

HIPÓTESIS

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados nos hemos planteado la siguiente hipótesis: “Existe asociación entre polimorfismos del antígeno 4 asociado al linfocito T Citotóxico (*CTLA-4*) y variantes genéticas del receptor de muerte celular programada *PDI* y la DM1 en la población chilena”.

OBJETIVO GENERAL

- Analizar la frecuencia alelica y genotípica de los polimorfismos PD 1.2; PD 1.5; PD 1.6 y PD 1.9 en pacientes diabéticos tipo 1 de Santiago.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la frecuencia de las variantes PD 1.2; PD 1.5; PD 1.6 y PD 1.9 en pacientes con DM1 y población control no diabética (Estudio Caso-Control).
- Determinar mediante ELISA el perfil de auto-inmunidad de anticuerpos anti-IA-2, anti-GAD65 en muestras de sueros de pacientes diabéticos y en controles.
- Determinar mediante ELISA la concentración serológica de la molécula CTLA-4 soluble en pacientes diabéticos y en controles.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Participantes del Estudio.

En este estudio participaron 160 niños debutantes con diabetes tipo 1 de la Región Metropolitana con un rango de edad de 2 - 14 años provenientes del Hospital San Borja Arriarán, más el CEDINTA asociado a la Fundación de Diabetes Juvenil. 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 160 muestras de niños sanos (grupo control) cuyo rango de edad y estrato socioeconómico fue similar al grupo de niños diabéticos.

3.2 Diseño de Estudio.

Para estudiar la posible asociación entre polimorfismos de *CTLA-4* y variantes genéticas del receptor de muerte programada *PDI* 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.

3.3 Extracción de DNA.

De cada uno de los participantes de este estudio se colectaron aproximadamente 5 mL de sangre periférica, la cual fue centrifugada a 275 x g en centrifuga clínica para separar el suero de las partículas en suspensión (eritrocitos, linfocitos y plaquetas principalmente). Se almacenaron 500 µL del suero de cada muestra para análisis posteriores, 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 1900 x g durante 10 minutos. Después de repetir este proceso 3 veces se resuspendió el residuo lisado con 1 mL de solución Chomczynski (CH₃N₃ x HSCN + H₂O; Winkler Ltda., Chile).

Después de 1 hora se agregaron 4 mL de etanol frío absoluto y se centrifugó a 1900 x g 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 absorvancia da

cuenta de la pureza de cada muestra. Las medidas fueron realizadas en un GeneQuant (Pharmacia Biotech, Cambridge, England).

3.4 Genotipificación.

Para determinar el genotipo del gen de PD-1 y cada uno de los polimorfismos estudiados PD 1.2; PD 1.5; PD 1.6 y PD 1.9 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). EL detalle de cada polimorfismo se presenta en la tabla siguiente con su respectiva secuencia de análisis experimental.

Tabla 1. Método PCR-RFLP, partidores PCR y enzimas de restricción (RE)

	SNP	UBICACION	METODO	RE	PARTIDORES
PD 1.2	6438 G/A	Intrón 2	PCR-RFLP	Msp I	F: 5'-AGCGGCACCTACCTCTGTGG-3' R: 5'-GTGGGCTGTGGGCACCTTCTG-3'
PD 1.5	7785 C/T	Exón 5	PCR-RFLP	Alu I	F: 5'-AGACGGAGTATGCCACCATT-3' R: 5'-CACTGTGGGCATTGAGACAT-3'
PD 1.6	8737 G/A	3'UTR	PCR-RFLP	Nla III	F: 5'-TCAGAAGAGCTCCTGGCTGT-3' R: 5'-GGGGAACGCCTGTACCTT-3'
PD 1.9	7625 C/T	Exón 5	PCR-RFLP	Bpu 10 I	F: 5'-GGACAGCTCAGGGTAAGCAG-3' R: 5'-AGGGTCTGCAGAACACTGGT-3'

Cada reacción de PCR fue realizada en 25 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 3 minutos a 95°C para la activación de la enzima, seguido de 35 ciclos que consistieron en un periodo de denaturación del DNA a 95°C por 15 segundos, un periodo de unión de los partidores a 64°C (PD 1.5; PD 1.2), 54°C (PD 1.9), 56°C (PD 1.6) y por 15 segundos y un periodo de extensión de la polimerasa a 72°C por 15 segundos. Para realizar el PCR se ocupó un Termociclador Biometra^R.

Para llevar a cabo el análisis RFLP se tomaron 6 µL de cada producto de PCR que fue incubado a 37°C durante 1 hora con 0,5 U de la endonucleasa de restricción apropiada para cada polimorfismo. El producto de digestión fue visualizado en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (Fig.5).

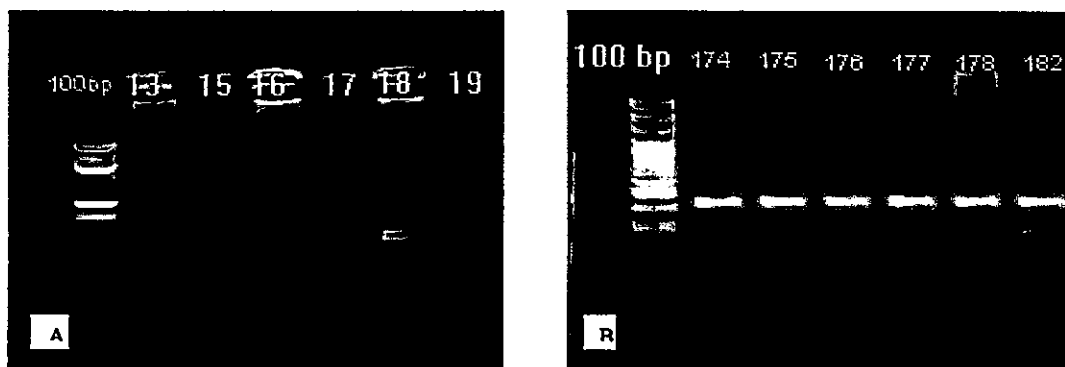


Figura 5. Fotografía de un gel de agarosa con productos de cortes de distintas muestras como ejemplo de los polimorfismos A (PD 1.2) y B (PD 1.9) estudiados.

3.5. Análisis Serológico.

La presencia de anticuerpos anti-GAD65 y anti-IA2 fue determinada mediante inmunoensayo enzimático (ELISA) con el uso de kits comerciales de la marca BioSource^R (California, USA). 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 streptavidina-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.

3.6 Análisis Estadístico.

Tanto el análisis de las frecuencias alelica 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

SHEsis, 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).

RESULTADOS

4.1 Características clínicas de los grupos de estudio.

La tabla N° 2, resume las características clínicas del grupo de niños con DM1 y los niños controles, desde el punto de vista de su distribución por edad, género y perfil de anticuerpos al momento de su ingreso al estudio.

Tabla 2. Características clínicas e inmunológicas de ambos grupos de estudio.

	Casos (n=160)	Controles (n=160)
Edad (años)	9,5 ± 3,3	10,7 ± 3,1
Hombre/Mujer	68/92	87/73
Edad de Diagnóstico (años)	8,2 ± 3,6	-
Total de anticuerpos (%)	73,4	1,25
Anti.GAD65 (%)	82,5	1,25
Anti-IA-2 (%)	64,3	0,00
Enfermedad autoinmune (%)	4,4	1,9
sCTLA-4 (ng/ml)	2,99 ± 1,70** (0.56 – 9.62)	1,43 ± 0,31 (0.56 – 2.88)

La tabla muestra resultados esperados para la distribución de anticuerpos siendo estos altamente positivos en el grupo con DM1. Como enfermedades autoinmunes asociadas (enfermedad celiaca y tiroiditis), se detectaron 6 casos en el grupo con DM1 y 3 casos en el grupo control.

4.2 Genotipificación.

Para el caso del polimorfismo 7785 C/T el tamaño observado de la banda de amplificación después de la electroforesis correspondió con las 333 pb esperadas. Después del tratamiento con la enzima Alu I, aquellas muestras que presentaban el SNP T en una de sus hebras fueron digeridas dando origen a 3 bandas: la de 333 pb correspondiente al producto de amplificación intacto sin el SNP, más dos bandas de 264 y 69 pb producto del corte enzimático en la otra hebra. 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).

Para el polimorfismo 7625 C/T el tamaño observado de la banda de amplificación correspondió con las 408 pb esperadas. Después del tratamiento con la endonucleasa Bpu 10I, aquellas muestras que presentaban el SNP C en una de sus hebras fue digerida dando origen a 3 bandas: la de 408 pb correspondiente al producto de amplificación más dos bandas de 260 y 145 pb producto del corte

enzimático. En las muestras homocigotas para el SNP (genotipo C/C) 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 T/T) (Fig. 5b)

Para el polimorfismo 6438 A/G el tamaño observado de la banda de amplificación correspondió con los 250 pb esperadas. Después del tratamiento con la endonucleasa Msp I, aquellas muestras que presentaban el SNP G en una de sus hebras fue digerida dando origen a 3 bandas: la de 380 pb correspondiente al producto de amplificación más dos bandas de 100 y 150 pb producto del corte enzimático. 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) (Fig. 5a)

Para el polimorfismo 8737 A/G el tamaño observado de la banda de amplificación correspondió con las 410 pb esperadas. Después del tratamiento con la endonucleasa Nla III, aquellas muestras que presentaban el SNP G en una de sus hebras fue digerida dando origen a 3 bandas: la de 410 pb correspondiente al producto de amplificación más dos bandas de 290 y 120 pb producto del corte enzimático. 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).

4.3 Análisis Serológico.

Se cuantifico la presencia de anticuerpos específicos contra elementos del páncreas como son los anticuerpos GA65 e IA2 en el grupo de pacientes diabéticos y el grupo control. Esta determinación realizada en los casos con DM1 mostró que los pacientes tienen en un alto porcentaje al menos uno de los dos anticuerpos con detección positiva, mientras que en el grupo control la detección de dichos anticuerpos fue prácticamente nula. Esto es concordante con lo esperado, ya que nos permite al menos deducir que nuestro grupo control, no manifiesta un comportamiento serológico que pudiera hacernos sospechar de anomalías pancreáticas autoinmunes en este grupo. El porcentaje observado en el grupo con DM1 se encuentra dentro de los porcentajes descritos.

De la misma manera, se determinó la concentración serológica de la molécula CTLA-4 soluble en ambos grupos de estudio. Al respecto, se observó que los niveles circulantes de sCTLA-4 estuvieron elevados en los pacientes diabéticos en relación al grupo control ($2,99 \pm 1,70$ vs $1,35 \pm 0,38$), $p < 0.02$). La distribución serológica de este marcador de regulación negativa de células T muestra datos controversiales en la literatura, siendo los valores elevados en patologías autoinmunes lo más frecuentemente descrito.

4.4 Análisis Genético.

Los resultados de las frecuencias genotípicas y alelica en el estudio caso/control en cada uno de los polimorfismos analizados se muestran en la tabla 3 y siguientes:

La tabla N° 3 muestra que la distribución del polimorfismo +49 A/G del gen de *CTLA-4* no fue diferente al comparar casos con DM1 y niños controles. Además, la muestra analizada se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. La distribución alelica y genotípica para esta variante es muy similar a la observada en otros estudios realizados en poblaciones de origen caucásico.

Tabla 3. Frecuencia genotípica y alelica en el estudio caso-control para la variante +49 A>G del gen *CTLA-4*.

Polimorfismo +49A>G	Caso		Control		Odds Ratio	95% IC	P. value
	n	Frec.	n	Frec.			
A/A	68	0,425	62	0,473			0,614362
A/G	70	0,438	55	0,420			
G/G	22	0,138	14	0,107			
Valor Hardy Weinberg	0,559329		0,730586				
% alelo A	206	0,644	179	0,683	0,837891	[0,592496~1,184921]	0,316921
% alelo G	114	0,356	83	0,317			

La tabla N° 4 muestra que la distribución del polimorfismo PD-1.2 no mostró diferencias estadísticamente relevantes al comparar casos con DM1 y niños controles. Existe una tendencia a una mayor frecuencia del genotipo G/G en el grupo con DM1. Se puede observar una frecuencia casi nula de la variante A/A en ambos grupo. La muestra analizada no se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 4. Frecuencia genotípica y alelica en el estudio caso-control para la variante PD 1.2 del gen *PDCD-1*.

Polimorfismo PD 1.2	Caso n Frec.	Control n Frec.	Odds Ratio	95% IC	P. value
A/A	1 0,06	1 0,06			0.403100
A/G	69 0,431	81 0,506			
G/G	90 0,562	78 0,487			
Valor Hardy Weinberg	0,001646	0,0006			
% alelo A	22,2	25,9	0.814197	[0.566142~1.170937]	0.267124
% alelo G	77,8	74,1			

La tabla N° 5 muestra que la distribución del polimorfismo PD-1.5 el cual mostró diferencias significativas al comparar casos con DM1 y niños controles, demostrándose una posible asociación de esta variante con DM1. Sin embargo, desde el punto de vista de su distribución en la población total, esta variante no muestra estar en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 5. Frecuencia genotípica y alelica en el estudio caso-control para la variante PD 1.5 del gen *PDCD-1*.

Polimorfismo PD 1.5	Caso		Control		Odds Ratio	95% IC	P. value
	n	Frec.	n	Frec.			
C/C	27	0,169	37	0,231			0.004487
C/T	129	0,806	107	0,669			
T/T	4	0,025	16	0,100			
Valor Hardy Weinberg	3.04e-016		5.05e-006				
% alelo C	57,2		56,6		1.025810	[0.750212~1.402651]	0.873155
% alelo T	42,8		43,4				

La tabla N° 6 muestra que la distribución del polimorfismo PD-1.6 el cual mostró diferencias significativas al comparar casos con DM1 y niños controles, indicando una posible asociación de esta variante con DM1. Sin embargo, desde el punto de vista de su distribución en el grupo control esta variante no muestra estar en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 6. Frecuencia genotípica y alelica en el estudio caso-control para la variante PD 1.6 del gen *PDCD-1*.

Polimorfismo PD 1.6	Caso		Control		Odds Ratio	95% IC	P. value
	n	Frec.	n	Frec.			
A/A	32	0,200	25	0,156			0.001650
A/G	71	0,444	102	0,637			
G/G	57	0,356	33	0,206			
Valor Hardy Weinberg	0,253396		0,000436				
% alelo A	42,2		47,5		0.806543	[0.590358~1.101895]	0.176622
% alelo G	57,8		52,5				

La tabla N° 7 muestra que la distribución del polimorfismo PD-1.9 no mostró diferencias significativas al comparar casos con DM1 y niños controles. No obstante, desde el punto de vista de su distribución en la población total, esta variante no muestra estar en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 7. Frecuencia genotípica y alelica en el estudio caso-control para la variante PD 1.9 del gen *PDCD-1*.

Polimorfismo PD 1.9	Caso n Frec.	Control n Frec.	Odds Ratio	95% IC	P. value
T/T	0	0			0.882187
T/C	133 0,831	27 0,169			
C/C	132 0,825	28 0,175			
Valor Hardy Weinberg	2.47e-019	7.00e-019			
% alelo T	58,4	58,8	0.987202	[0.720747~1.352163]	0.936017
% alelo C	41,6	41,2			

La tabla N° 8 muestra el análisis de haplotipos considerando todos los polimorfismos analizados para el gen *pdcd-1*.

Los resultados de la tabla N° 8 muestran que los haplotipos CCGA (12,2 %; OR=1,859) y TTGG (19,6 %; OR= 2,362) son bastante más frecuentes en la población con DM1 generando los más altos OR en este análisis, en ambos casos estos haplotipos podrían llegar a constituirse en marcadores de predisposición para la enfermedad. Las combinaciones haplotípicas TTGA, TCGA y TCGG mostraron los

valores más bajos de OR, presentaron una muy baja frecuencia en el grupo con DM1 y podrían plantearse como haplotipos de protección.

Tabla 8. Frecuencias haplotípicas relevantes entre casos y controles para los polimorfismos PD 1.2; PD 1.5; PD 1.6 y PD 1.9 del gen de *PDCD-1*.

Haplotipos	Frecuencia Casos	Frecuencia Controles	Odds Ratio	95 % IC
CCGA	12.2%	7.1%	1,859	[1.080~3.202]
CCGG	27.3%	26.5%	1,069	[0.752~1.521]
CTAA	2.2%	8.4%	0,250	[0.107~0.582]
CTGA	6.0%	4.7%	1,319	[0.658~2.641]
CTGG	7.2%	9.1%	0,790	[0.447~1.398]
TCGA	0.5%	3.5%	0,134	[0.025~0.733]
TCGG	0.1%	4.1%	0,028	[0.003~0.244]
TTAA	14.9%	14.4%	1,066	[0.687~1.656]
TTGA	4.9%	9.3%	0,514	[0.273~0.966]
TTGG	19.6%	9.6%	2,362	[1.485~3.758]

Frecuencias <0.03 en casos y controles no fueron consideradas.

La tabla Nº 9 muestra las combinaciones genotípicas para las variantes *PD-1* en casos con DM1 y controles.

Se puede observar, que hay dos combinaciones genotípicas que muestran los más altos valores de OR al comparar casos y controles: AG CT AG TT (OR = 2,5) y GG

CT AG CT (OR = 2.7) ambas combinaciones más frecuentes entre los pacientes con DM1 comparativamente a los niños controles.

Tabla 9. Combinación genotípica para los polimorfismos de *PD-1* en pacientes diabéticos y controles.

Combinación genotípica para PD 1.2 1.5 1.6 1.9	Casos n	Controles n	Odds Ratio	95% IC
AG CC AG CT	8	10	0.800	[0.31574 – 2.02698]
AG CT AA CT	12	9	1.333	[0.56182 – 3.16434]
AG CT AG CT	23	25	0.920	[0.52222 – 1.62077]
AG CT AG TT	10	4	2.500	[0.78408 – 7.97109]
GG CC AG CT	7	11	0.636	[0.24669 – 1.64156]
GG CC GG CT	8	4	2.000	[0.60225 – 6.64175]
GG CT AG CT	24	9	2.667	[1.23954 – 5.73689]
GG CT GG CT	23	22	1.045	[0.58272 – 1.87563]

Finalmente, la tabla N° 10 muestra el efecto de “dosage” genético del polimorfismo +49 A/G de CTLA-4 sobre los genotipos PD-1.

La tabla N° 10 permite observar que cuando se considera la presencia adicional de la variante +49 A/G de CTLA-4, específicamente si se toma en cuenta al alelo de riesgo “G”, las medidas de asociación a enfermedad aumentan considerablemente, considerando este “dosage” genético la combinación AG CT AG TT aumenta su asociación de OR = 2,5 a OR= 3,125 y la combinación GG CT AG CT modifica su asociación con DM1 de un OR = 2.7 a OR= 3,333, indicando que la asociación de estas dos condiciones de riesgo (CTLA-4 + PD-1) podrían operar sinérgicamente en el riesgo al desarrollo de DM1.

Tabla10. Combinación genotípica de los polimorfismos de *PD-1* según genotipos de la variante +49A>G de *CTLA-4* portadoras del alelo G en pacientes diabéticos y controles.

Combinación genotípica para PD 1.2 1.5 1.6 1.9	Odds Ratio	95% IC
AG CC AG CT	-----	-----
AG CT AA CT	1.667	[0.4683517 – 5.930966]
AG CT AG CT	1.150	[0.3871984 – 3.415562]
AG CT AG TT	3.125	[0.7069594 – 13.81356]
GG CC AG CT	0.795	[0.2109003 – 3.000224]
GG CC GG CT	2.500	[0.5477749 – 11.4098]
GG CT AG CT	3.333	[0.9993081 – 11.1188]
GG CT GG CT	1.306	[0.4358022 – 3.91869]

DISCUSIÓN

La DM1 es una enfermedad en la que interactúan factores genéticos y ambientales. Desde el punto de vista inmunológico ha sido descrita como eminentemente autoinmune, aunque los mecanismos de origen apoptótico cada día adquieren mayor relevancia en su etiología. Desde el punto de vista de la distribución de los autoanticuerpos, nuestros resultados mostraron 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. Estos resultados no son sorprendentes, puesto que desde hace tiempo se conoce que la presencia de una batería de anticuerpos como: GAD65, IA2 e IAA se manifiestan en el inicio de la DM1 y se han asociado con un mayor riesgo para desarrollar esta patología (24). Un aspecto importante a considerar, es el hecho que la presencia de alguno de estos anticuerpos por sí solo, tiene un bajo valor predictivo para la enfermedad. Además, se observó la presencia del marcador CTLA-4 soluble en concentraciones mayores en pacientes con DM1 que en controles sanos, lo que haría pensar que se podría asociar a DM1 (86), sin embargo este fenómeno se muestra controversial en la literatura, puesto que hay reportes que apoyan o contradicen este comportamiento (88).

Dado el importante rol que manifiestan tanto la molécula PD-1 como CTLA-4 en la regulación negativa de la proliferación de células T, estos inmuno-receptores han sido

objeto de innumerables estudios con el fin de establecer su relación con patologías de origen autoinmune (46, 47, 77). Considerando que estas proteínas son una señal muy relevante en los procesos de regulación negativa de las células T (41), se han realizado múltiples análisis genéticos que evidencian la asociación de varios polimorfismos en las proximidades del gen *pdc1-1* (45) y *ctla-4* (83) respectivamente, de entre los cuales figuran los polimorfismos PD 1.2, PD 1.5, PD 1.6, PD 1.9 y +49A>G, como 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 analizar su distribución en población chilena.

En este sentido, nuestro estudio mostró que los polimorfismos PD 1.5 y PD 1.6 tienen una asociación cruda mayor que los polimorfismos PD 1.2, PD 1.9 y +49A>G con esta enfermedad. Sin embargo, ningún polimorfismo en forma individual alcanzó un nivel de relevancia como para ser considerado un marcador genético de la DM1.

Lo anterior, reafirma una vez más el hecho de que los factores de riesgo genéticos encontrados hasta la fecha en la DM1 no son absolutos, se distribuyen heterogéneamente entre las distintas poblaciones humanas, probablemente debido a la activa participación de factores ambientales en la etiología de la enfermedad (26-29).

En base a los análisis realizados en este estudio, 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 actual que indican que nuestra población está compuesta principalmente por individuos de ascendencia caucásica. No obstante, se debe considerar que el tamaño muestral es aún pequeño para realizar consideraciones mayores.

En términos generales se puede decir que la interacción entre los polimorfismos de los genes *PD-1* y *CTLA-4* en la regulación negativa de la tolerancia periférica asociado a diabetes tipo 1 se mantiene en intensa discusión hasta la fecha, dado que algunos reportes indican una fuerte asociación para tales polimorfismos en ciertas poblaciones, mientras que otros estudios desmienten tal efecto (69, 70). Uno de los desafíos pendientes corresponde a evidenciar el papel biológico de estas variantes genéticas en la funcionalidad del linfocito T, particularmente para *PD-1*, puesto que nuestros datos preliminares indican que, por lo menos la variante +49 A/G del gen de *CTLA-4* existen antecedentes de que es capaz de asociarse a respuestas diferenciales de un efector de apoptosis como caspasa 3.

Existen evidencias que establecen que el gen *pd-1* y sus moléculas ligando son un regulador negativo eficiente de la activación del linfocito T (84), además se ha planteado que esta molécula y/o sus ligandos podrían ser considerados como un marcador de “agotamiento” de células T, es decir, pérdida de regulación negativa, hiperactivación y alteración apoptótica de la célula T activada. (85).

Experimentos realizados en modelos animales (ratones) deficientes del gen *pdc1-1* favorecen la aparición de enfermedades autoinmunes (65,66). Se ha observado que al bloquear la interacción del receptor PD-1 con su ligando PD-L1 existe una reversión del fenotipo “agotado”. Esto se llevo a cabo administrando anticuerpos anti-PD-L1, lo que resultó en la reactivación de las células T, aumentando la producción de citoquinas, su proliferación y su actividad citotóxica (85).

Además de la diabetes tipo 1 existen otras enfermedades de origen autoinmune asociadas con fuerte susceptibilidad a la misma región génica que hemos estudiado como por ejemplo: Lupus Eritematoso Sistémico (48), Artritis Reumatoide (57), Espondilitis Anquilosante (59), Encefalomiелitis autoinmune (60), enfermedad hepática autoinmune (61,62) y Cirrosis biliar (63). De esta forma, los datos aportados por este y todos los trabajos relacionados con *PD-1* ayudan a comprender mejor la compleja etiología reflejada en la mayoría de las enfermedades autoinmunes.

Recientemente (2008), se ha demostrado que alteraciones intestinales estarían asociadas a pacientes con diabetes tipo 1 o con individuos en riesgo de desarrollar ésta enfermedad. Este estudio propone un modelo hipotético acerca de la contribución de varios componentes intestinales a la patogénesis de la diabetes tipo 1 (87). Esta nueva forma de visualizar la enfermedad le da un énfasis particular a las células T, las cuales cumplirían un papel central en el equilibrio de tolerancia. La propuesta ha generado un extenso debate y la concepción de un “intestino perforado”, es decir, cuando las paredes del intestino han desarrollado un orificio en todo su espesor, lo

cual dentro del marco de esta patología permitiría una mayor exposición del sistema inmune intestinal a ciertos antígenos comunes, que en presencia de una microbiota alterada reduciría la auto-tolerancia mediada por las células T reguladoras. En este nuevo escenario, los estudios dirigidos a la caracterización de polimorfismos funcionales en la célula T adquieren una relevancia fundamental.

CONCLUSION

Los polimorfismos PD 1.5 y PD 1.6 son más frecuentes en el grupo de los pacientes diabéticos en comparación al grupo control, lo que indica que estos polimorfismos están más asociados con esta enfermedad que los polimorfismos PD 1.2, PD 1.9 y +49A>G, los cuales no presentan diferencias significativas en ambos grupos de estudio.

Además, tal asociación pareciera tener un marcado efecto de “dosage” genético donde se considera la presencia adicional del genotipo G/G de la variante +49A>G de CTLA-4, atribuyéndole a este genotipo un efecto mucho más agresivo de la enfermedad.

La asociación de estas dos condiciones de riesgo (*CTLA-4* + *PD-1*) podría operar sinérgicamente en el riesgo al desarrollo de DM1.

También, cabe mencionar que si bien parte de estos 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.

REFERENCIAS

1. 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.*
2. Geneva: WHO; 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance.
3. Anjos S, Polychronakos C. Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes: beyond HLA. *Mol Gen and Metab* 2004, 81:187-95.
4. Bach JF. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2005, 25:74-80.
5. Hyoty H. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann Med* 2002, 34:138-47.
6. Myers MA, Hettiarachchi KD, Ludeman JP, Wilson AJ, Wilson CR, Zimmet PZ. Dietary microbial toxins and type 1 diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2003, 1005:418-22.
7. Pearce SHS, Merriman TR. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. *TRENDS Mol Med* 2006, 12: 90-98.
8. Devendra D, Eisenbarth GS. Immunologic endocrine disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2003, 111:624-36.
9. Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, et al. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of highrisk HLA haplotypes. *Lancet* 2004, 364: 1699-700.
10. Gale EA. 2002. The rise of childhood type 1 diabetes in the twentieth century. *Diabetes* 51:3353-61.
11. Mathis, Diane, Luis Vence, and Christophe Benoist. "β cell death during progression to diabetes." *Nature*. 2001, 414: 792-798.

12. 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.
13. Viskary H, Ludvigsson J, Uiho 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
14. Santos JL, Pérez-Bravo F, Carrasco E, et al. 2000. Association between HLA-DQB1*0201 and DQB1*0302 alleles with type 1 diabetes do not depend on cytomegalovirus antibody status at onset: a case-parent study conducted in Chile. *Immunol and Cell Biol* 78:259-63.
15. Scott FW, Rowsell P, Wang GS, Burghardt K, Kolb H, Flohe S. 2002. Oral exposure to diabetes-promoting food or immunomodulators in neonates alters gut cytoquines and diabetes. *Diabetes* 51:73-78.
16. Pérez-Bravo F, Carrasco E, Gutiérrez-López MD, et al. 1996. Genetic predisposition and environmental factors leading to the development of insulin-dependent diabetes mellitus in Chilean children. *J Mol Med* 74: 105-9.
17. Scott FW. 1996. Food-induced type 1 diabetes in the BB rat. *Diabetes Metab Rev* 12:341-59.
18. 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.
19. Carrasco E, Angel B, Codner E, García D, Ugarte F, Bruzzone ME, Pérez F. Incidencia de diabetes tipo 1 en Santiago de Chile: análisis por comunas de la Region Metropolitana en el periodo 2000-2004. *Rev Med Chile* 2006, 134: 1258-1264.
20. Carrasco E, Pérez-Bravo F, Dorman JS, Mondragón A, Santos JL. Increasing incidence of type 1 diabetes in population from Santiago of Chile: Trends in a period of 18 years (1986-2003). *Diab Metab Res Rev* 2006, 22(1): 34-37.
21. Kawasaki E, Abiru N, Eguchi K. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of β cell damage. *Diab Res and Clin Pract* 2004, 66:27-32.

22. Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *ILAR J* 2004, 45:278-91.
23. Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases-disorders of immune homeostasis. *Nat Rev* 2006, 7: 917-928.
24. Bingley PJ, Bonifacio E, Mueller PW. Diabetes Antibody Standardization Program: first assay proficiency evaluation. *Diabetes* 2003, 52:1128-36.
25. Wang J, Miao D, Babu S, Yu J, Barker J, et al. Prevalence of autoantibody-negative diabetes is not rare at all ages and increases with older age and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92: 88-92.
26. Gale EA. A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia* 2002, 45:588-94.
27. Winkler C, Mollenhauer U, Hummel S, et al. Exposure to environmental factors in drinking water: risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes. The BABYDIAB study. *Horm Metab Res* 2008, May 21 (Epub ahead of print).
28. Arkkola T, Uusitalo U, Kronberg-Kippila C, et al. Seven distinct dietary patterns identified among pregnant Finnish women--associations with nutrient intake and sociodemographic factors. *Public Health Nutr* 2008, 1(2):176-82
29. TRIGR Study Group. Study design of the Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk (TRIGR). *Pediatric Diab* 2007, 8(3):117-37.
30. Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004, 33:1-16.
31. Hawa MI, Beyan H, Buckley LR, Graham RD. Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes. *Am J Med Genet* 2002, 115: 8-17.

32. Ounissi-Benkalha H, Polychronakos C. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanism. *TRENDS Mol Med* 2008, may 2008.
33. Alizadeh BZ, Koeleman BPC. Genetic polymorphisms in susceptibility to type 1 diabetes. *Clin Chim Acta* 2008, 387: 9-17.
34. Thomsom G, Valdes AM, Noble JA, et al. Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. *Tissue Antigens* 2007, 70: 110-127.
35. Chentoufi AA, Polychronakos C. 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* 2002, 51:1383-90.
36. Kavvoura F, Loannidis J. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2005, 162:3-16.
37. Vaidya B, Pearce S. The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. *Euro J of Endo* 2004, 150:619-26.
38. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* 2004, 36:337-8.
39. Vang T, Miletic AV, Arimura Y, et al. Protein tyrosine phosphatases in autoimmunity. *Ann Rev Autoimmunity* 2008, 26: 29-55.
40. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Ann Rev Immunol* 2008, 26: 677-704.
41. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulatin autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007, 8: 239-245.
42. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 2007, 19: 813-824.

43. Ansari MJI, Salama AD, Chitnis T, et al. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 2003, 198: 63-69.
44. Fife BT, Guleria I, Gubbels M, et al. Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by PD-1-PD-L1 pathway. *J Exp Med* 2006, 203: 2737-2747.
45. Hiromine Y, Ikegami H, Fujisawa T et al. Molecular scanning of the gene for programmed cell death-1 (PDCD1) as a candidate for type diabetes susceptibility. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1079: 285-288.
46. Okazaki T, Wang J. PD-1/PD-L pathways and autoimmunity. *Autoimmunity* 2005, 38: 353-357.
47. Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet* 2005, 50 (5): 264-266.
48. Johansson M, Arlestig L, Moller B, et al. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2005, 52: 1665-1669.
49. Wang Q, Ye D, Yin J, et al. Programmed cell death 1 genotypes are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus among Chinese. *Arch Dermatol Res* 2007, 300: 91-93.
50. Wang SC, Chen YJ, Ou TT, et al. Programmed death-1 gene polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus in Taiwan. *J Clin Immunol* 2006, 26: 506-511.
51. Lin AC, Yen JH, Tsai JJ, et al. Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2004, 50: 770-775.
52. Thorburn CM, Prokunina-Olsson L, Sterba KA, et al. Association of PDCD1 genetic variation with risk and clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort. *Genes Immunol* 2007, 8: 279-287.

53. Prokunina L, Castillejo-López C, Oberg F, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002, 32: 666-670.
54. Velásquez-Cruz R, Orozco L, Espinosa-Rosales F, et al. Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 2007, 15: 336-341.
55. Ferreiros-Vidal I, Gómez-Reino JJ, Barros F, et al. Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2004, 50: 2590-2597.
56. Ferreiros-Vidal I, D'Alfonso S, Papasteriades C, et al. Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. *Genes Immunol* 2007, 8: 138-146.
57. Kong EK, Prokunina-Olson L, Hing-Sang W, et al. A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese. *Arthritis & Rheumatism* 2005, 52: 1058-1062.
58. Iwamoto T, Ikari K, Inoue E, et al. Failure to confirm association between PDCD1 polymorphism and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *J Hum Genet* 2007, 52: 557-560.
59. Lee SH, Lee YA, Woo DH, et al. Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population. *Arthritis Res & Therapy* 2006, 8: R163.
60. Salama AD, Chitnis T, Imitola J, et al. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2003, 198: 71-78.
61. Mataka N, Kikuchi K, Kawai T, et al. Expression of PD-1, PD-L1 and PD-L2 in the liver in autoimmune liver diseases. *Am J Gastroenterol* 2007, 102: 302-312.
62. Oikawa T, Takahashi H, Ishikawa T, et al. Intrahepatic expression of the co-stimulatory molecules programmed death-1 and its ligands in autoimmune liver disease. *Pathol Int* 2007, 57: 485-492.

63. Juran BD, Atkinson EJ, Schlicht EM, et al. Interacting alleles of the coinhibitory immunoreceptor genes cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and programmed cell-death 1 influence risk and features of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2008, 47: 563-574.
64. Braun-Prado K, Petzl-Erler ML. Programmed death cell gene (PDCD1) polymorphisms and pemphigus foliaceus (fogo selvagem) disease susceptibility. *Gen Mol Biol* 2007, 30: 314-321.
65. Wang J, Yoshida T, Nakaki F, et al. Establishment of NOD-Pdcd1 ^{-/-} mice as an efficient animal model of type 1 diabetes. *PNAS* 2005, 102: 11823-11828.
66. Yoshida T, Jiang F, Honjo T, Okazaki T. PD-1 deficiency reveals various tissue-specific autoimmunity by H-2b and dose-dependent requirement of H-2g7 for diabetes in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105 (9): 3533-3538.
67. Wan L, Hancock WW. Programmed cell death (PD-1) and its ligands PD-L1 are required for allograft tolerance. *Eur J Immunol* 2007, 37: 2983-2990.
68. He FR, Zhu HF, Huang H, Dai YD, Shen X, et al. Programmed death 1 ligands transfected dendritic cells loaded with glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) inhibits both alloresponse and the GAD65 reactive lymphocyte response. *Clin Exp Immunol* 2008, 151 (1): 86-93.
69. Asad S, Nikamo P, Torn C, Landin-Olsson M, Lernmark A, et al. No evidence of association of the PDCD1 gene with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2007, 24 (12): 1473-1477.
70. Cooper JD, Smyth DJ, Bailey R, Payne F, Downes K, et al. The candidate genes TAF5L, TCF7, PDCD1, IL6 and ICAM1 cannot be excluded from having effects in type 1 diabetes. *BMC Med Genet* 2007, 8
71. Nielsen C, Hansen D, Husby S, et al. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 2003, 62: 492-497.
72. Ni R, Ihara K, Miyako K, et al. PD-1 gene haplotype is associated with the development of type 1 diabetes mellitus in Japanese children. *Hum Genet* 2007, 121: 223-232.

73. Hiromine Y, Ikegami H, Fujisawa T, Nojima K, Kawabata Y et al. Trinucleotide repeats of programmed cell death-1 gene are associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *Metabolism* 2007, 56 (7): 905-909.
74. Simmonds MJ, Gouch SC. Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond. *Clin Exp Immunol* 2004, 136: 1-10.
75. Zhou Y, Huang D, Paris P, et al. An analysis of CTLA-4 and proinflammatory cytokine genes in Wegener's granulomatosis. *Arthritis & Rheumatism* 2004, 50: 2645-2650.
76. Blomhoff A, Lie BA, Myhre AG, et al. Polymorphisms in the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene region confers susceptibility to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89: 3474-3476.
77. Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003, 423: 506-511.
78. Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA-4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 1997, 6: 1275-1282.
79. Nistico L, Buzzetti R, Pritchard L, et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with type 1 diabetes. *Hum Mol Genet* 1996, 5: 1075-1080.
80. Van der Auwera BJ, Vandewalle CL, Schuit FC et al. CTLA-4 gene polymorphism confer susceptibility to insulin-dependent (IDDM) independently from age and from other genetic or immune disease markers. The Belgian Diabetes Registry. *Clin Exp Immunol* 1997, 110: 98-103.
81. Mochizuki M, Amemia S, Kobayashi K, et al. Association of the CTLA-4 gene 49 A/G polymorphism with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease in Japanese children. *Diabetes Care* 2003, 26: 843-847.
82. Liang H, Yagi K, Asano A, et al. Association between CTLA-4 +49A/G polymorphism and type 1B diabetes in Japanese population. *Endocrine* 2004, 25: 105-110.

83. Anjos SM, Tessier MC, Polychronakos C. Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89: 6257-6265.
84. Okazaki T., Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *TRENDS in immunology* 2006, 27(4).
85. Riley J., June C. The road to recovery: translating PD-1 biology into clinical benefit. *TRENDS in immunology* 2006, 28(2).
86. Gillespie K. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ* 2006, 175(2).
87. Vaarala O., Atkinson M., Neu J. The "Perfect Storm" for Type 1 Diabetes: The Complex Interplay Between Intestinal Microbiota, Gut Permeability, and Mucosal Immunity. *Diabetes* 2008, 57: 2555-2562.
88. Purohit S, Podolsky R, Collins C, et al. Lack of correlation between the levels of soluble cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and the CT-60 genotypes. *J Autoimmune Dis* 2005, 2: 8-13.

ANEXO.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Diabetes Research and Clinical Practice

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diabres

International Diabetes Federation



Interactions between programmed death 1 (PD-1) and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) gene polymorphisms in type 1 diabetes

Scherezade Momin^{a,1}, Sylvia Flores^{b,1}, Bárbara Angel B^b, Ethel Codner D^c,
Elena Carrasco P^d, Francisco Perez-Bravo^{b,*}

^aUniversity of Michigan, Ann Arbor, MI, USA

^bLaboratory of Nutritional and Genetic Epidemiology, Institute of Nutrition and Food Technology (INTA),
University of Chile, Av. El Líbano 5524, Casilla 138-11, Santiago, Chile

^cInstitute of Maternal and Child Research (IDIMI), San Borja Arriarán Hospital, School of Medicine, University of Chile, Chile

^dDiabetes Unit, San Juan de Dios Hospital, Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2008

Received in revised form

19 November 2008

Accepted 2 December 2008

Published on line 14 January 2009

Keywords:

PD-1 gene

CTLA-4

Type 1 diabetes

Genetic epidemiology

ABSTRACT

Aim: To explore the contribution of the PD-1 gene polymorphisms involved in T1D as well as the relationship between the PD-1/CTLA-4 genes and soluble CTLA-4 concentrations.

Patients and methods: 261 incident cases of T1D and 280 healthy children less 15 years old were included in this study. Haplotypes for polymorphisms of the PD-1 and CTLA-4 genes were determined by PCR and RFLP methods. Screening for soluble CTLA-4 was done using an ELISA assay. Statistical analysis was performed using the online SHESIS package.

Results: Our results show that sCTLA-4 levels were higher in T1D than in controls (2.99 ± 1.7 ng/ml versus 1.43 ± 0.31 ng/ml, $p < 0.001$). The allele dosage of CTLA-4 on PD-1 haplotypes, showing a significant modified effect of G carriers over AA genotype on the sCTLA-4 concentrations (5.48 ± 2.09 ng/ml versus 3.27 ± 1.30 ng/ml, $p < 0.03$ in T-C haplotype) and (1.92 ± 0.79 ng/ml versus 3.41 ± 1.10 ng/ml, $p < 0.02$ in C-T haplotype).

Conclusion: Consistent with the higher serum sCTLA-4 levels observed in other autoimmune diseases, our results suggest that sCTLA-4 is elevated in T1D. Our data suggest a possible gene dosage effect of "G" CTLA-4 carriers on sCTLA-4 over the possible protective or susceptible effect conferred by PD-1 haplotypes.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

T1D is a T cell-mediated autoimmune disease characterized by the self-destruction of the insulin secreting (β) cells in the pancreas by means of interactions between genes and environmental factors [1–5]. Antigen presenting cells (APC) present β cells as antigens to T cells, causing T cell

proliferation and the inevitable destruction of β cells by means of several mechanisms [6–9]. The programmed death-1 (PD-1) molecule is a negative regulator of T cells. PD-1 belongs to the immunoglobulin receptor superfamily, encodes a 55-kDa type 1 transmembrane inhibitory immunoreceptor, and is responsible for the negative regulation of T cell activation and peripheral tolerance [10–12]. Expression of PD-1 was observed

* Corresponding author. Tel.: +56 2 978 1454.

E-mail address: fperez@inta.cl (F. Perez-Bravo).

¹ These authors contributed equally to this work.

0168-8227/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.diabres.2008.12.003

only in activated T and B cells. During T and B cell activation, PD-1 is actively expressed on the cell surface. Interaction of PD-1 with its corresponding ligands PDL-1 and PDL-2 (both B7 family ligands) activates the cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif of PD-1, and therefore induces the inhibitory signal to inhibit T and B cell proliferation in order to maintain peripheral tolerance [13,14]. Furthermore, both PD-1^{-/-} and CTLA-4^{-/-} mice have shown development of several autoimmune diseases [15–19].

There has been a surprising increase of incidence of T1D in Chile in the last 20 years, from a low incidence within the indigenous Mapuche population [20] to the present conformation of the Chilean population. The incidence of T1D in children <15 years old in the metropolitan region of Santiago (the melting pot of Chile) was estimated to be as low as 2.36/100,000 inhabitants 18 years ago, however during the last years the incidence rate has triplicated [21,22]. However, this strongly contrasts with the incidence rate of T1D in Spain and other Latin-American countries of Spanish or Portuguese heritage. This indicates that both PD-1 and CTLA-4 could be considered as candidate genes for the susceptibility to T1D in the Chilean population. The aim of this study was to explore the contribution of the polymorphisms of non-HLA genes PD-1 and CTLA-4 to T1D, as well as the relationship between these candidate genes with soluble CTLA-4 serum concentrations.

2. Subjects and methods

Incident cases of T1D, children and adolescents younger than 15 years old with recent diagnosis of T1D. The youngsters were included only if a maximum period of 10 days after diagnosis had elapsed. Two hundred and sixty-one unrelated patients (111 male, 150 female) with T1D were investigated for the CTLA-4 + 49A/G and PD-1 (1.5 and 1.9) polymorphisms. T1D was diagnosed based on the American Diabetes Association diagnostic criteria. Two hundred and eighty unrelated healthy children (127 female, 153 male) without diabetes or a family history of autoimmune diseases were recruited as controls. Autoimmune diseases in the family were excluded by a questionnaire that evaluated the presence of thyroid disorders, Graves' and rheumatoid arthritis. The presence of ketoacidosis was evaluated in the T1D group. The criteria for diagnosis of diabetic ketoacidosis were glucose ≥ 300 mg/dL, plasma bicarbonate < 15 mequiv/L, pH < 7.3 , ketonemia and an elevated anion gap. A serum sample for measurement of β pancreatic auto-antibodies and sCTLA-4 levels was obtained within ten days after diagnosis of T1D. The protocol was approved by the institutional review board of INTA/University of Chile. All parents signed informed consents.

3. DNA isolation and genotyping of CTLA-4 and PD-1

From every patient and control we extracted and obtained 3 mL of peripheral blood. From each sample, serum supernatant and solid residues were separated by centrifugation. A total of 500 μ L of serum was saved for auto-antibodies and sCTLA-4 analysis. Genomic DNA was extracted from periph-

eral blood. Genotypes for the polymorphic restriction sites of the PD-1 gene (PD-1.5 and PD-1.9) were obtained by DNA amplifications using standard PCR and specific sets of primers, followed by the restriction fragment length polymorphism method (RFLP). The CTLA-4 + 49A/G polymorphism, which encodes a threonine (GCC) to alanine (ACC) substitution at codon 17 in exon 1 of the CTLA-4 gene, was amplified by PCR from genomic DNA, using the following primers: forward 5'-GCTCTACTTCTGAAGACCT-3'; reverse 5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3'. 0.25 μ g genomic DNA was amplified in each 25- μ L PCR reaction containing 50 μ M of each dNTP (Invitrogen, USA), 2 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA), 2.5 μ L of 10 \times PCR buffer and 0.8 μ M of each primer. The reaction mixture was first heated at 95 °C for 4 min and amplification was done for 40 cycles in a PCR thermocycler (Biometra Cycler, Germany) by denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s in each cycle. The products were then kept at 4 °C until further use. Ten microlitres of PCR products were mixed with 5 μ L (2 U/ μ L) of BbvI restriction enzyme (New England Biolabs, UK) solution and incubated at 37 °C overnight. DNA fragments were resolved in 2.0% agarose gels at 80 V. Ethidium bromide staining was used to reveal the fragments under UV (260 nm) light. The sequences of the primers were as follows: PD-1.5 primers 5'AGACGGAGTATGCCAACCATT3' (forward), 5'CACTGTGGGCATTGAGACAT3' (reverse), and PD-1.9 primers 5'GGACAGCTCAGGGTAAGCAG3' (forward), 5'AGGGTCTGCAGAGGGTCTGCAGAACACTGGT3' (reverse). At the end of each PCR, we performed a checkpoint for amplification on a 1% agarose gel. The gels were visualized by ethidium bromide staining under UV light. SNP PD-1.5C/T was analyzed by PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. The reaction conditions were as follows. A 25- μ L reaction mixture (2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 0.1 μ M primers, 1 U of Taq DNA polymerase [Invitrogen] and 50 ng of genomic DNA) was amplified by PCR. The conditions were initial denaturation for 3 min at 95 °C, then three cycles of: 95 °C for 15 s, 64 °C for 15 s, and 72 °C for 15 s. For SNP PD-1.9 T/C, the reaction conditions were as follows. A 25- μ L reaction mixture (1.2 mM MgCl₂, 150 μ M dNTP, 0.1 μ M primers, 1 U of Taq DNA polymerase [Invitrogen]) was amplified by PCR. The conditions were initial denaturation for 3 min at 95 °C, then three cycles of: 95 °C for 15 s, 54 °C for 15 s, and 72 °C for 15 s. Subsequent RFLP analysis was performed to determine the PD-1.5 C/T (dbSNP rs#cluster id. Rs2227981) and PD-1.9 T/C (dbSNP rs#cluster id. Rs2227982) SNPs using AluI (New England Biolabs Inc.) and Bpu10I (New England Biolabs Inc.), respectively.

4. Serum parameters

Screening for serological anti-GAD65 and anti-IA2 auto-antibodies was performed in duplicate by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) from Medizym[®] Diagnostic (Berlin, Germany). The Medizym[®] anti-GAD and anti-IA-2 were calibrated against the WHO reference preparation NIBSC 97/550. Both determinations were semi-quantitative methods. Using a cut-off of 10 IU/ml, the Medizym[®] anti-GAD shows a sensitivity of 92.3% and a specificity of 98.6%. On the other hand, the anti-IA-2 assay has a sensitivity of 75% and a

Table 1 – Clinical characteristics of T1D patients and control subjects.

	T1D patients	Control subjects
n	261	280
Sex (male/female)	111/150	153/127
Age (year)	9.47 ± 3.32	10.66 ± 3.05
Age at onset (year)	8.2 ± 3.6	–
Islet auto-antibodies ^a (%)	73.4%	1.42%
Duration of disease ^b (year)	0.51 ± 0.18	–
Autoimmune disease ^c (%)	1.9	2.5
sCTLA-4 (ng/ml)	2.99 ± 1.70 ^{**} (0.56–9.62)	1.43 ± 0.31 (0.56–2.88)

^a GAD65 and IA-2.

^b At sample recollection.

^c Celiac disease and thyroid disease (tested by anti-tTG and anti-TPO antibodies).

^{**} $p < 0.001$.

specificity of 98%. The values are in the medium range observed for this technique in the Diabetes Antibody Standardization Program (DASP) [23]. The screening for anti-transglutaminase (tTG) and anti-thyroid antibodies (TPO) were determined by means of conventional ELISA (Biohit, Finland and Milenia Biotec, Germany). Serum concentrations of CTLA-4 were determined by ELISA development system (Biosource, Invitrogen). This assay has a linear range between 0.5 and 10 ng/ml. Each sample was analyzed in duplicate.

5. Statistical analysis

Comparisons of the haplotype and genotype frequencies between cases and controls were performed using the chi-square test and Fisher's exact test using the online SHESIS package (URL: <http://202.120.7.14/analysis/myAnalysis.php>). Hardy-Weinberg equilibrium was tested using a χ^2 good-

ness-of-fit test. Comparisons of continuous variables across study groups were performed with Student's t-test and the Mann-Whitney test. Tests showing $p < 0.05$ were considered to be significant and data are presented as mean ± S.D. and CI 95%.

6. Results

Clinical and demographic information is presented in Table 1. The age of T1D at diagnosis was 8.2 ± 3.6 years. 73.4% of the patients were positive for auto-antibodies GAD65 or IA-2 (79.1% GAD65 and 67.7% IA-2). Four healthy children were positive for GAD65 (1.42%).

Serum sCTLA-4 levels were higher in T1D than in controls (2.99 ± 1.70 ng/ml and 1.43 ± 0.31 ng/ml, $p < 0.001$). In the T1D patients, no differences in sCTLA-4 were observed between positive and negative auto-antibodies profile (GAD65 or IA-2).

Table 2 – Genotype and allele frequencies of PD-1 and CTLA-4 polymorphisms in T1D children and healthy controls.

CTLA-4 or PD-1 polymorphism	Patients (n = 261)		95% CI	Controls (n = 280)		95% CI	p-Value ^a
	N	Freq.		N	Freq.		
+49 A/G							
A/A	113	0.433	0.365–0.503	131	0.469	0.381–0.558	NS
A/G	112	0.429	0.360–0.498	119	0.423	0.336–0.512	
G/G	36	0.138	0.094–0.192	30	0.108	0.060–0.174	
% A allele	64.8		68.1				
% G allele	35.2		31.9				
PD 1.5							
T/T	12	0.046	0.023–0.081	28	0.100	0.058–0.157	0.01
C/T	183	0.700	0.637–0.758	187	0.669	0.590–0.741	
C/C	66	0.253	0.199–0.313	65	0.231	0.168–0.304	
% T allele	39.66		43.44				
% C allele	60.34		56.56				
PD 1.9							
T/T	57	0.218	0.169–0.273	49	0.175	0.119–0.242	0.01
C/T	202	0.774	0.718–0.823	229	0.819	0.750–0.875	
C/C	2	0.008	0.000–0.027	2	0.006	0.000–0.034	
% T allele	60.54		58.44				
% C allele	39.46		41.56				

NS: non-significant.

^a Chi-square or Fisher's exact test.

There were no significant differences for genotypic frequencies between T1D cases and healthy controls in the genetic analysis of +49 A/G CTLA-4 (Table 2). For PD-1.9, the percentage of C and T alleles in each population was approximately the same. However, as shown in Table 2, there is a significant ($p < 0.01$) gene frequency for T/T in the PD-1.5 and PD-1.9 genetic analysis. The frequency of T/T in PD-1.5 was 2 times higher in the control group than in the T1D case group.

As shown Table 3, we observed significant differences for the sCTLA-4 between T1D patients and healthy children in all +49 A/G genetic categories of CTLA-4 ($p < 0.001$). Among T1D group we observed a significant increase of sCTLA-4 between carriers and non-carriers of G allele in CTLA-4 (AA = 2.20 ± 0.92 ng/ml; AG = 2.97 ± 0.65 ng/ml and GG = 4.01 ± 1.97 ng/ml, $p < 0.01$). There seems to be a gene dosage effect for the concentrations of sCTLA-4 among the different +49 A/G genotypes of CTLA-4.

In relation with the PD-1 haplotypes (PD-1.5-PD-1.9), the most commonly observed haplotype in the Chilean population was C-T (0.498 in T1D patients and 0.332 in healthy children, $p < 0.02$). A significant frequency of the haplotype T-C was observed among T1D patients compared with the control group (0.230 versus 0.041, $p < 0.01$), and a significant frequency of the T-T haplotype was detected among healthy children compared than T1D patients (0.139 versus 0.396, $p < 0.01$). Probably, the high frequency observed in the TT distribution in healthy subjects suggests a possible "protective" effect of this combination against T1D.

A comprehensive analysis was done between PD-1 complex genotypes, +49 A/G alleles of CTLA-4 and sCTLA-4 plasmatic concentrations in T1D cases (Table 4 summarizes the data). The allele dosage of CTLA-4 on PD-1 haplotypes, showing a significant modified effect of G carriers over AA genotype on the sCTLA-4 concentrations (5.48 ± 2.09 ng/ml versus 3.27 ± 1.30 ng/ml, $p < 0.03$ in T-C haplotype and 1.92 ± 0.79 ng/ml versus 3.41 ± 1.10 ng/ml, $p < 0.02$ in C-T haplotype). The value of sCTLA-4 seems to have a differential response in relation to carrier (G) or non-carrier (AA genotype) in CTLA-4. It is possible to think that there is a regulation effect of this allele over the susceptible or protective PD-1 genotype.

7. Discussion

We observed increased frequencies of PD-1.5 (TT) in healthy controls and a little association for SNP PD-1.9 in patients

Table 3 - Effect of CTLA-4 +49 A/G variant on sCTLA-4 levels in Chilean population.

CTLA-4 polymorphism	T1D cases (n = 261)	Control children (n = 280)	p-Value
AA	$2.20 \pm 0.92^*$	1.08 ± 0.25	<0.001
AG	$2.97 \pm 0.65^*$	1.52 ± 0.38	<0.001
GG	$4.01 \pm 2.00^{**}$	1.48 ± 0.27	<0.001
	2.99 ± 1.70	1.43 ± 0.31	

* $p < 0.03$ (AA versus AG in T1D group).

** $p < 0.01$ (AA versus GG in T1D group).

Table 4 - PD-1 haplotypes and soluble CTLA-4 levels according to +49 A/G alleles of CTLA-4 polymorphism in Chilean patients with T1D.

PD 1.5-PD 1.9 haplotype	+49 A/G CTLA-4 allele dosage	Concentrations of sCTLA-4 (ng/ml)	Corrected p-value
T-T	AA	0.88 ± 0.37	NS
T-T	Carrier G	1.58 ± 0.83	
T-C	AA	3.27 ± 1.30	0.03
T-C	Carrier G	5.48 ± 2.09	
C-C	AA	2.74 ± 1.22	NS
C-C	Carrier G	3.46 ± 1.24	
C-T	AA	1.92 ± 0.79	0.02
C-T	Carrier G	3.41 ± 1.10	

regarding T1D. When we constructed complex haplotypes, we found that PD-1.5-PD-1.9 (C-T) was the most frequent haplotype among the Chilean population.

In our T1D population, polymorphisms of PD-1 were different from those expected under Hardy-Weinberg equilibrium. There are several possible explanations for the existence of allelic association and deviation from this law. One possibility is that there is population stratification in the samples; this is always a concern in population-based studies. It is best addressed by using family-based studies, such as the transmission/distortion test. The other possibility is biased sampling of patients or non-random mating in this population. The accordance of our patient recruitment protocol showed no evidence of this. The deviation from Hardy-Weinberg equilibrium may also indicate that the markers are near a disease-related gene. The conformation of the Chilean population is a mix of Caucasian and Amerindian genes with a predominance of European genes as shown by the HLA class II typing studies. In South America, the incidence of type 1 diabetes is usually lower than in North America and Europe, this may be due to differences in local genetic pools (Amerindian and Negroid genes). The influence of Caucasoid genes (mainly from Spain and Italy in the case of Chile) is reflected by differences in HLA class II allele distributions in some countries. For example, among T1D cases the frequency of DQB1*0201 is only 29% in Chile but 48% in Uruguay and Argentina where the incidence of T1D is higher. DQB1*0302 occurred in 47% of the T1D in Chile, compared to 37% in Uruguay. It is possible that these genetic differences can contribute to the differential risk for T1D in Latin-American peoples and influenced the local genetic pools in Chile related to T1D.

Interestingly, when we compared the levels of sCTLA-4 across the CTLA-4 genotypes seem to be a gene dosage effect among the different +49 A/G genotypes (GG > GA > AA). On the other hand, when we establish the main PD-1 haplotypes in T1D patients and healthy children, the observed effect of the CTLA-4 allele dosage over sCTLA-4 was similar independently of the "protective" or "susceptible" role of the PD-1.5-PD-1.9 haplotype.

It would be interesting to execute this study in populations with high susceptibility to T1D and populations with low susceptibility to T1D. These data may provide a starting point for further investigations of whether the defect in PD-1 or

CTLA-4 expression and function plays an important role in the pathogenesis of T1D.

This suggests that the CTLA-4 allele regulates the susceptibility effects of the PD-1 polymorphisms. These results are in accordance with the mechanisms proposed by Ueda et al. [24], who suggested that SNP (CT60 –A/G) in the 3'UTR of the CTLA-4 gene may determine the efficiency of the splicing and production of sCTLA-4 mRNA. Our results on +49 A/G polymorphisms showed a potential reduction of sCTLA-4 in T1D carriers of the G allele. In contrast, Purohit et al. [25] found no evidence to indicate that CTLA-4 levels are decreased in patients compared to controls and found no significant correlation regarding antibody status.

The results show that a functionally important polymorphism in PD-1 is associated with a subset of T1D. A polymorphism in these genes has previously been shown to be associated with several autoimmune diseases [26–32]. Published observations show that there is a large variation in the frequencies of PD-1 polymorphisms among different ethnic groups. The frequency of the PD-1.5C allele in Chinese (71%) was found to be significantly greater than in Caucasians (50–57%), but our reported frequency was comparable with the frequency in Mexicans (61%) [30,32]. A similar difference in SNP frequencies between Hong Kong Chinese and Europeans has been observed for several cytokine genes, such as interleukin-10 [32]. This discrepancy in the frequencies of polymorphisms indicates that genetic variation, which may predispose some ethnic groups to autoimmunity or, as proposed by our study above, protect some ethnic groups from autoimmunity, may not be present in other ethnic groups, even though the polymorphism plays a functional role in associated diseases. Kong and Prokunina-Olsson studied PD-1.5 in patients with Rheumatoid Arthritis (RA) and found that PD-1.5 had no significance in the progression of the disease [31,33]. We found PD-1.9 to have a little significance in TT distribution in patients; however, the PD-1.5 SNP data suggest that it may have a protective effect on T1D. The PD-1 SNP has been examined in several studies, but only in SLE and RA patients. Ferreiros-Vidal et al. [27,28] studied PD-1.1, PD-1.2, PD-1.3, PD-1.5, PD-1.6 and PD-1.9 SNPs in Spanish patients with SLE. They found that the PD-1.9 minor allele was very rare and reported an incidence of less than 1.1% in 186 patients with SLE and 0% in the control group of 186 individuals, as a result, there were few studies done on PD-1.9 SNPs. Other results as those from Lee et al. [34] suggest that the PD-1.9 T allele is more frequent in other populations than in the Spanish population. Recent evidences have shown that in T1D the role of PD1 is contradictory in relation with the studied population [35–39]. In conclusion, we have provided evidence that PD-1.5 is associated with decreased risk for T1D in Chilean individuals residing in Santiago, Chile. We have also demonstrated that PD-1.9 has no association with T1D and have provided preliminary data to support the hypothesis that the carrier (G) CTLA-4 allele regulates the concentrations of sCTLA-4 on the susceptibility of the PD-1 gene. These findings should direct future studies toward identification of the mutation and understanding of its functional polymorphism significant for the development of T1D and other autoimmune diseases.

Acknowledgements

This work was supported by FONDECYT Grant 1060790 (Prof. Francisco Pérez-Bravo). We thank all families participating in this investigation and the logistic support of San Borja Arriarán Hospital, Roberto del Rio Hospital and the Chilean Juvenile Diabetes Foundation. The study described was supported in part by Grant Number T37 MD001425-09, from the National Center of Minority Health & Health Disparities, National Institutes of Health. Its contents are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] Y. Park, Functional evaluation of the type 1 diabetes (T1D) susceptibility candidate genes, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 77S (2007) 110–115.
- [2] J.F. Bach, Infections and autoimmune diseases, *J. Autoimmun.* 25 (2005) 74–80.
- [3] B.Z. Alizadeh, B.P.C. Koeleman, Genetic polymorphisms in susceptibility to type 1 diabetes, *Clin. Chim. Acta* 387 (2008) 9–17.
- [4] M.A. Myers, K.D. Hettiarachchi, J.P. Ludeman, A.J. Wilson, C.R. Wilson, P.Z. Zimmet, Dietary microbial toxins and type 1 diabetes, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1005 (2003) 418–422.
- [5] E.A. Gale, A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia* 45 (2002) 588–594.
- [6] S.H.S. Pearce, T.R. Merriman, Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity, *Trends Mol. Med.* 12 (2006) 90–98.
- [7] E. Kawasaki, N. Abiru, K. Eguchi, Prevention of type 1 diabetes: from the view point of β cell damage, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 66 (2004) 27–32.
- [8] H. Ounissi-Benkalha, C. Polychronakos, The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanism, *Trends Mol. Med.* 14 (2008) 268–275.
- [9] P.A. van der Merwe, S.J. Davis, Molecular interactions mediating T cell antigen recognition, *Annu. Rev. Immunol.* 21 (2003) 659–684.
- [10] T. Okazaki, J. Wang, PD-1/PD-L pathways and autoimmunity, *Autoimmunity* 38 (2005) 353–357.
- [11] M.E. Keir, M.J. Butte, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, PD-1 and its ligands in tolerance and immunity, *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008) 677–704.
- [12] P.K. Gregersen, T.W. Behrens, Genetics of autoimmune diseases—disorders of immune homeostasis, *Nat. Rev.* 7 (2006) 917–928.
- [13] A.R. Sharpe, E.J. Wherry, R. Ahmed, G.J. Freeman, The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 239–245.
- [14] Y. Hiromine, H. Ikegami, T. Fujisawa, Y. Kawabata, S. Noso, K. Yamaji, et al., Molecular scanning of the gene for programmed cell death-1 (PDCD1) as a candidate for type 1 diabetes susceptibility, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1079 (2006) 285–288.
- [15] M.J. Ansari, A.D. Salama, T. Chitnis, R.N. Smith, H. Yagita, H. Akiba, et al., The programmed death-1 (PD-1) pathway

- regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 63-69.
- [16] B.T. Fife, I. Guleria, M. Gubbels Bupp, R.N. Smith, H. Yagita, H. Akiba, et al., Insulin-induced remission in new-onset NOD mice is maintained by PD-1-PD-L1 pathway, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 2737-2747.
- [17] A.D. Sanlioglu, T. Griffith, A. Omer, E. Dirice, R. Sari, A.H. Altunbas, et al., Molecular mechanisms of death ligand-mediated immune modulation: a gene therapy model to prolong islet survival in type 1 diabetes, *J. Cell Biochem.* 104 (2008) 710-720.
- [18] J.P. Mordes, R. Bortell, E.P. Blankenhorn, A.A. Rossini, D.L. Greiner, Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity, *ILAR J.* 45 (2004) 278-291.
- [19] W. Teft, M. Kirchhof, J. Madrenas, A molecular perspective of CTLA-4 function, *Annu. Rev. Immunol.* 24 (2006) 65-97.
- [20] G. Larenas, G. Arias, O. Espinoza, M. Charles, O. Landaeta, S. Villanueva, et al., Prevalence of diabetes mellitus in a Mapuche community of Region IX, Chile, *Rev. Med. Chile* 113 (1985) 1121-1125.
- [21] E. Carrasco, F. Pérez-Bravo, J.L. Santos, G. López, M. Calvillán, C. Wolff, et al., One of the lowest validated incidence rates of insulin dependent diabetes mellitus in the Americas: Santiago, Chile, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 34 (Suppl. 1) (1996) S153-S157.
- [22] E. Carrasco, F. Pérez-Bravo, J.S. Dorman, A. Mondragón, J.L. Santos, Increasing incidence of type 1 diabetes in population from Santiago of Chile: trends in a period of 18 years (1986-2003), *Diabetes Metab. Res. Rev.* 22 (1) (2006) 34-37.
- [23] P.J. Bingley, E. Bonifacio, P.W. Mueller, Diabetes Antibody Standardization Program: first assay proficiency evaluation, *Diabetes* 52 (2003) 1128-1136.
- [24] H. Ueda, J.M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, et al., Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease, *Nature* 423 (2003) 506-511.
- [25] S. Purohit, R. Podolsky, C. Collins, W. Zheng, D. Schatz, A. Muir, et al., Lack of correlation between the levels of soluble cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and the CT-60 genotypes, *J. Autoimmune Dis.* 2 (2005) 8-13.
- [26] D.K. Sanghera, S. Manzi, F. Bontempo, W. Zheng, D. Schatz, A. Muir, Role of an intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies, *Hum. Genet.* 115 (2004) 393-398.
- [27] I. Ferreira-Vidal, J.J. Gómez-Reino, F. Barros, A. Carracedo, P. Carreira, F. González-Escribano, et al., Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 2590-2597.
- [28] I. Ferreira-Vidal, S. D'Alfonso, C. Papasteriades, F.N. Skopouli, M. Marchini, R. Scorza, et al., Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe, *Genes Immunol.* 8 (2007) 138-146.
- [29] L. Prokunina, L. Padyukov, A. Bennet, U. de Faire, B. Wiman, J. Prince, et al., Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope, *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 1770-1773.
- [30] S.C. Lin, J.H. Yen, J.J. Tsai, W.C. Tsai, T.T. Ou, H.W. Liu, et al., Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 50 (2004) 770-775.
- [31] L. Prokunina, C. Castillejo-López, F. Oberg, I. Gunnarsson, L. Berg, V. Magnusson, et al., A regulatory polymorphism in the PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans, *Nat. Genet.* 32 (2002) 666-669.
- [32] W.P. Chong, W.K. Ip, W.H. Wong, C.S. Lau, T.M. Chan, Y.L. Lau, et al., Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus, *Genes Immunol.* 5 (2004) 484-492.
- [33] E.K. Kong, L. Prokunina-Olsson, W.H. Wong, C.S. Lau, T.M. Chan, M. Alarcón-Riquelme, et al., A new haplotype of PDCD1 is associated with rheumatoid arthritis in Hong Kong Chinese, *Arthritis Rheum.* 52 (2005) 1058-1062.
- [34] S.H. Lee, Y.A. Lee, D.H. Woo, R. Song, E.K. Park, M.H. Ryu, et al., Association of the programmed cell death 1 (PDCD1) gene polymorphism with ankylosing spondylitis in the Korean population, *Arthritis Res. Ther.* (2006) 163.
- [35] C. Nielsen, D. Hansen, S. Husby, B.B. Jacobsen, S.T. Lillevang, Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes, *Tissue Antigens* 62 (2003) 492-497.
- [36] R. Ni, K. Ihara, K. Miyako, M. Inuo, H. Kohno, T. Hara, PD-1 gene haplotype is associated with the development of type 1 diabetes mellitus in Japanese children, *Hum. Genet.* 121 (2007) 223-232.
- [37] Y. Hiromine, H. Ikegami, T. Fujisawa, K. Nojima, Y. Kawabata, S. Noso, et al., Trinucleotide repeats of programmed cell death-1 gene are associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus, *Metabolism* 56 (2007) 905-909.
- [38] F.R. He, H.F. Zhu, H. Huang, Y.D. Dai, X. Shen, M. Wang, et al., Programmed death 1 ligands transfected dendritic cells loaded with glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) inhibits both alloresponse and the GAD65 reactive lymphocyte response, *Clin. Exp. Immunol.* 151 (2008) 86-93.
- [39] S. Asad, P. Nikamo, C. Torn, M. Landin-Olsson, A. Lernmark, M. Alarcón-Riquelme, et al., No evidence of association of the PDCD1 gene with type 1 diabetes, *Diabet. Med.* 24 (2007) 1473-1477.