

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Polimorfismo +49 A/G del gen del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) en la diabetes tipo 1: Asociación con el perfil de anticuerpos y citoquinas

Francisco Pérez B¹, Ethel Codner D², Bárbara Angel B¹, Iván Balic N^{1a}, Elena Carrasco P^{3b}.

+49 A/G genetic polymorphism of cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4) in type 1 diabetes: Association with autoantibodies and cytokines

Background: Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4) has been one of the non HLA genes more commonly studied in type 1 diabetes mellitus (T1D). CTLA-4 is a co-stimulation protein that has a key role in the negative regulation of T cells and is related with a functional cytokine imbalance, generating a T helper (Th) 1 over Th2 dominance. **Aim:** To analyze the association of +49 A/G polymorphism of CTLA-4 and its relationship with autoantibodies and cytokine expression in recently diagnosed T1D patients. **Patients and Methods:** CTLA-4 genetic variants and auto-antibody levels were studied in 260 children with T1D and 255 healthy children matched by age and gender. +49 A/G polymorphism of CTLA-4 was studied by polymerase chain reaction and restriction fragment polymorphism (PCR-RFLP). Autoantibody levels were measured by conventional ELISA. A panel of 60 cytokines was studied simultaneously by serum array analysis in 15 T1D and 15 healthy controls stratified according CTLA-4 genotype. **Results:** The +49 A/G genetic frequency was similar in T1D cases and healthy children. A positive anti-GAD65 and anti-IA-2 level was observed in 67.3% of T1D group. This percentage was increased among GG carriers (79.4% to GAD65 and 70.6% to IA-2). Finally, T1D patients carrying this genotype showed a high expression of interleukin 2, 10, tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. **Conclusions:** The +49 A/G polymorphism of CTLA-4 was similar in diabetic and control children. Among patients with T1D and carriers of GG genotype, a higher frequency of anti-GAD65 and a preferential Th1 cytokine expression profile was observed (Rev Méd Chile 2009; 137: 321-8).

(Key words: CTLA-4 antigen; Cytokines; Diabetes Mellitus, type 1)

Recibido el 14 de julio, 2008. Aceptado el 28 de noviembre, 2008.

Investigación financiada con el proyecto FONDECYT 1060790.

¹Laboratorio de Epidemiología Nutricional, Genética y Salud Pública. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile. ²Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), Universidad de Chile. ³Unidad de Diabetes, Hospital San Juan de Dios, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago de Chile

^aBiotecnólogo

^bNutricionista

Correspondencia a: Dr. Francisco Pérez-Bravo. Laboratorio de Epidemiología Nutricional y Genética, INTA-Universidad de Chile. Casilla 138-11, Santiago. E mail: fperez@inta.cl

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmune, órgano-específica que se caracteriza por la destrucción de las células β pancreáticas a través de mecanismos de necrosis o apoptosis mediado por células T reactivas¹⁻⁴. Su etiología es compleja y en ella se han involucrado factores genéticos y ambientales como participantes directos en el proceso inmunológico de destrucción celular⁵⁻⁸. Desde el punto de vista genético, existe una gran diversidad de genes que se han relacionado a la enfermedad, comenzando desde las clásicas asociaciones con el sistema HLA, hasta recientes proteínas asociadas a la actividad y funcionalidad de las células T⁹⁻¹⁰. Dentro de los genes candidatos estudiados se encuentra la región denominada *IDDM12* localizada en el cromosoma 2q3, que codifica para regiones claves en la regulación del linfocito T, entre ellas el gen del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (*CTLA-4*)¹¹⁻¹³.

El gen de *CTLA-4* contiene cuatro exones y diversos sitios polimórficos que se han relacionado con patologías de origen autoinmune¹¹. El gen de *CTLA-4* ha sido propuesto desde hace varios años como un gen candidato en diversas enfermedades autoinmunes entre ellas la enfermedad de Addison, enfermedad celíaca y la tiroiditis autoinmune¹⁴⁻¹⁷. El polimorfismo +49 A/G del gen *CTLA-4* ha sido asociado positivamente a DM1 en diversas poblaciones de países como Rusia, Polonia, España, Italia, Alemania y Bélgica¹⁸⁻²³. Sin embargo, también existe una serie de publicaciones en población japonesa, Reino Unido y Estados Unidos de Norteamérica que no muestran el mismo grado de asociación²⁴⁻²⁶.

El polimorfismo +49 A/G del gen *CTLA-4* ha sido intensamente estudiado desde el punto de vista de su impacto sobre características de la DM1, de este modo la presencia del alelo G ha mostrado un importante grado de asociación con una edad más temprana de debut y con perfiles específicos de autoanticuerpos²⁷⁻³⁰. Estudios *in vitro*, han relacionado la presencia del alelo G con bajos niveles de ARN mensajero para la molécula soluble *CTLA-4* (*sCTLA-4*), describiéndose un posible papel funcional en el balance negativo de las células T reactivas³¹⁻³².

En la DM1 el desequilibrio Th1/Th2 es un proceso gravitante mientras se produce el fenómeno de infiltración de células T a nivel pancreá-

tico (insulinitis). A nivel de mecanismo, tanto las moléculas del complejo HLA, como las moléculas de regulación negativa (*CTLA-4*; CD95; PD-1) están capacitadas para señalar al linfocito la inducción de determinadas citoquinas³³. Dentro de las respuestas Th1 es posible observar la inducción de TNF α , IL-1 β , IL-2 e INF γ , como moléculas con actividad pleiotrópica sobre la célula β . Th1 facilita la respuesta del complejo celular, mientras que Th2 (IL-4, IL-10) favorece la respuesta de tipo citotóxico. Todas ellas son reguladas por el complejo Th3 el cual ejerce su papel a través de TGF β -1³⁴. Dada la fuerte evidencia que relaciona el importante papel de las citoquinas en la perpetuación de la muerte de la célula β pancreática, el propósito de este estudio ha sido analizar la distribución del polimorfismo +49 A/G del gen *CTLA-4* en casos con DM1 y niños controles de Santiago y su relación con los autoanticuerpos GAD65 e IA-2 y perfil de citoquinas involucradas en los procesos necróticos o apoptóticos que subyacen a la aparición de la DM1.

PACIENTES Y MÉTODOS

El estudio corresponde a un diseño caso-control realizado en la Región Metropolitana. Los casos incidentes de DM1 correspondieron a niños y adolescentes menores de 15 años con diagnóstico reciente de la enfermedad (definido como evento ocurrido en las 3 semanas previas al ingreso al estudio), provenientes de diversos centros hospitalarios de la Región Metropolitana (Hospitales San Borja-Arriarán, Exequiel González Cortés y San Juan de Dios). Un total de 260 pacientes con DM1 (119 niñas y 141 niños) fueron incorporados al estudio. El grupo control estuvo formado por 255 niños aparentemente sanos (138 niñas y 117 niños), sin antecedentes familiares de diabetes u otras enfermedades autoinmunes (datos obtenidos mediante encuesta familiar). Los niños controles fueron contactados de tres colegios de Santiago (comunales de Quinta Normal, Independencia y Macul), se escogieron al azar en un llamado abierto y voluntario realizado en cada colegio por intermedio de los centros de padres respectivos por lo que estimamos que son comparables en términos de su estatus sociogenético respecto de los casos con DM1. En todos los casos y controles se analizó la frecuencia

para el polimorfismo +49 A/G del gen *CTLA-4* y un perfil de autoinmunidad compuesto por los anticuerpos GAD65 e IA-2.

En forma paralela al estudio de frecuencias genotípicas, se seleccionaron 30 niños del grupo total (15 DM1 y 15 niños controles) para realizar un segundo estudio de perfil de citoquinas utilizando un ELISA que determina en forma simultánea un patrón de distribución de 60 citoquinas. Este estudio descriptivo, consideró a los niños portadores de los genotipos GG y AA para el gen de *CTLA-4* determinado previamente.

El protocolo de esta investigación fue aprobado por los comités de ética respectivos y todos los pacientes, controles o sus padres o tutores entregaron su consentimiento por escrito.

EXTRACCIÓN DE ADN Y DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO *CTLA-4*

El ADN genómico se extrajo a partir de una muestra de sangre periférica (3 ml) utilizando técnicas estándares de lisis celular (Winkler, Santiago, Chile). El polimorfismo +49 A/G del gen *CTLA-4* se determinó mediante la utilización de partidores específicos (forward 5'- GCTCTACTTCCTGAAGACCT -3' y reverse 5'- AGTCTCACTCACCTTTGCAG -3') que identifican la sustitución treonina (GCC) por alanina (ACC) en el codón 17 del exón 1 de *CTLA-4*. 0,25 µg ADN genómico se amplificaron mediante PCR en un volumen total de 25 µl; 50 µM de cada dNTPs (Invitrogen, USA), 2 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, USA), 2,5 µl de 10 x PCR *buffer*; 0,8 µM de cada partidore. Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas de la siguiente forma: denaturación inicial a 95°C por 4 min y 40 ciclos de amplificación consistentes en: denaturación a 95°C por 30 s, alineamiento a 56°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s en cada ciclo, con una extensión final en el último ciclo a 72°C durante 10 min; 10 µl de producto amplificado fueron incubados por dos horas a 37°C con 5 µl (2 U/µl) de la enzima de restricción BbvI (New England Biolabs, UK) y el patrón de restricción fue resuelto en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

ANÁLISIS SEROLÓGICO DE ANTICUERPOS

Se realizó un análisis serológico semicuantitativo de anticuerpos anti-GAD₆₅ y anti-IA2 a través de un

enzimoinmunoanálisis (ELISA) con las muestras en duplicado (Medizym[®] Diagnostic, Berlin, Alemania). Ambas determinaciones utilizan un punto de corte de 10 UI/ml y se obtuvo una sensibilidad y especificidad de 92,3% y 98,6% para anti-GAD65 y de 75% y 98% para anti-IA-2. Todos los valores se encuentran dentro de los rangos esperados para un ELISA de acuerdo al programa DASP (*Diabetes Antibody Standardization Program*)³⁵.

ELISA SIMULTÁNEO DE CITOQUINAS

Para la determinación en forma simultánea de citoquinas se utilizó una matriz comercial para el análisis de 60 proteínas (*Ray Bio Human Cytokines Antibody Array 6*; Ray Biotech Inc, USA). Esta matriz permite identificar la expresión de múltiples citoquinas en una muestra de plasma o suero. Es un sistema cualitativo que permite detectar concentraciones límites de citoquinas que suelen quedar fuera de rango por sistemas de ELISA convencional (ejemplo valores ≤4 pg/ml). La muestra sérica diluida (1:10) se incubó con una membrana de nylon previamente bloqueada, incubándose toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces luego de la incubación, evitando deshidratación antes de ser expuestas a la mezcla de anticuerpos conjugados con biotina. En una segunda incubación a 4°C durante toda la noche, las membranas fueron reveladas mediante autorradiograma con tiempos de exposición de 3 a 5 minutos. La Figura 1 muestra la matriz utilizada en este análisis (*Ray Bio Human Cytokine Antibody Array 6*).

Los resultados de expresión de citoquinas obtenidos a través de esta matriz se definieron como: No detectada (ND), Baja Expresión y Alta Expresión luego de la integración de la intensidad densitométrica a partir del registro obtenido en el autorradiograma.

Estadística. Las comparaciones de frecuencia alélicas y genotípicas entre casos y controles fueron analizadas mediante las pruebas de Chi-cuadrado y prueba exacta de Fisher utilizando el programa SHEsis (URL: <http://202.120.7.14/analysis/myAnalysis.php>). Se evaluó la concordancia de las frecuencias genotípicas con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg mediante la prueba exacta de χ^2 . Las comparaciones de las otras

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n
1	PCS	PCS	NEG	NEG	Blank	Angiogenin	BDNF	BLC	BMP-4	BMP-6	CKβ 8-1	CNTF	EGF	Eotaxin
2	PCS	PCS	NEG	NEG	Blank	Angiogenin	BDNF	BLC	BMP-4	BMP-6	CKβ 8-1	CNTF	EGF	Eotaxin
3	Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6	FGF-7	Fit-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF	I-309	IFN-γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
4	Eotaxin-2	Eotaxin-3	FGF-6	FGF-7	Fit-3 Ligand	Fractalkine	GCP-2	GDNF	GM-CSF	I-309	IFN-γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
5	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1α	IL-1β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
6	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1α	IL-1β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
7	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1δ	MIP-3α	NAP-2	NT-3	PARC
8	Leptin	LIGHT	MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCP-4	M-CSF	MDC	MIG	MIP-1δ	MIP-3α	NAP-2	NT-3	PARC
9	PDGF-BB	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1	TGF-β3	TNF-α	TNF-β	Blank	Blank	Blank	Blank	POS
10	PDGF-BB	RANTES	SCF	SDF-1	TARC	TGF-β1	TGF-β3	TNF-α	TNF-β	Blank	Blank	Blank	Blank	POS

Figura 1.

variables de estudio (perfil de anticuerpos) se analizaron a través de proporciones mediante la prueba t de Student. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los resultados observados en la Tabla 1 muestran las características clínicas de los grupos de estudio. No se observaron diferencias para la distribución por género, ni distribución por edad en ambos grupos. El 67,3% de los pacientes con DM1 presentaron niveles detectables de al menos uno de los dos anticuerpos anti-GAD65 o anti-IA-2. El porcentaje de anti-GAD65 tuvo un porcentaje mayor (70,2%). En este estudio, sólo un niño control dio positivo para este anticuerpo.

La distribución de frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo +49 A/G de *CTLA-4* se

muestra en la Tabla 2. No se observaron diferencias al comparar el grupo de niños con DM1 versus el grupo control. La muestra analizada se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos grupos analizados.

La Tabla 3, muestra la distribución de los anticuerpos anti-GAD65 y anti-IA-2 en el grupo de niños con DM1 de acuerdo a la frecuencia genotípica de *CTLA-4*. Tanto para anti-GAD65, como para anti-IA-2, es posible observar un gradiente desde el genotipo AA (60,3% y 59,5%) hasta el genotipo GG (79,4% y 70,6%). La comparación de esta distribución de anticuerpos entre los genotipos *CTLA-4* no arrojó significancia estadística. Sin embargo, se observa una marcada tendencia ($p = 0,065$ para anti-GAD) a una mayor proporción de este marcador de autoinmunidad en los genotipos portadores del alelo G.

La expresión de las principales citoquinas se describe en la Tabla 4. Se resume el resultado de 13

Tabla 1. Características clínicas y de autoinmunidad β pancreática en ambos grupos

	Casos DM1	Controles
n	260	255
Sexo (Hombre/Mujer)	141/119	117/138
Edad (años)	13,8 ± 5,3	11,3 ± 1,7
Edad al diagnóstico (años)	9,4 ± 4,7	-
Perfil de anticuerpos positivos (%) ¹	67,3	0,78
Anticuerpos anti-GAD65 (%)	70,2	0,78
Anticuerpos anti-IA-2 (%)	64,3	0,00

¹(GAD65 + IA-2)

Tabla 2. Distribución de alelos y genotipos para el polimorfismo +49 A/G del gen *CTLA-4* en casos con DM1 y controles de Santiago

Genotipos <i>CTLA-4</i>	DM1 N Frec.	IC 95%	Controles N Frec.	IC 95%	Pearson's p-value
+49 A/G					
A/A	116 0,45	0,365-0,503	110 0,43	0,381-0,558	
A/G	110 0,42	0,361-0,498	106 0,42	0,336-0,512	
G/G	34 0,13	0,094-0,192	39 0,15	0,060-0,174	0,76
Total	260		255		
% alelo A	65,6			63,9	
% alelo G	34,2			36,1	0,54
Hardy-Weinberg p-value	0,33			0,11	

Tabla 3. Distribución de anticuerpos anti-GAD65 y anti-IA-2 de acuerdo a los genotipos +49 A/G del gen *CTLA-4* en el grupo de pacientes con DM1

Genotipo +49 A/G del gen <i>CTLA-4</i>	Anti.GAD		Anti-IA-2	
	Positivos	(%)	Positivos	(%)
AA (n =116)	70	60,3	69	59,5
GA (n =110)	78	70,9	69	62,7
GG (n =34)	27	79,4	24	70,6
Total (n =260)	175	67,3	162	62,3

*p =0,065 para anti-GAD65 entre genotipo AA versus GG

citoquinas cuya expresión ha sido expresada en tres categorías: No detectada, señal baja y señal alta. En el grupo DM1 se observaron cuatro patrones de alta expresión para IL-2, IL-10, TNF α e INF γ , específicamente en aquellos niños portadores del genotipo GG del gen *CTLA-4*. El grupo de niños controles mostró una mayor expresión para las citoquinas IL-4, IL-5, IL-6 y TGF β 1 al compararlos con los niños con DM1 en los dos genotipos (AA y GG). Por último, mediante este sistema, fueron indetectables las citoquinas IL-1 α , IL-1 β y TGF β 3 tanto en casos, como en controles.

DISCUSIÓN

La importancia de la molécula *CTLA-4* en la modulación de la respuesta inmune, ha sido evidenciada por los innumerables estudios realiza-

dos desde hace varios años con el fin de establecer su relación con patologías de origen autoinmune²⁻³. En este contexto, nuestro estudio mostró que la distribución del polimorfismo +49 A/G del gen *CTLA-4* es semejante en DM1 chilenos que en la población general y su frecuencia alélica y genotípica es comparable a la descrita previamente en poblaciones caucásicas¹⁸⁻¹⁹.

En el año 2005, una amplia revisión de 33 estudios que observaron la asociación del gen *CTLA-4* con la DM1, concluyó que el único polimorfismo con mejor asociación con DM1 correspondía a la variante +49 A/G del gen *CTLA-4*, a pesar de la heterogeneidad de las poblaciones analizadas³⁶. Desde el punto de vista de los autoanticuerpos, nuestros resultados indican que más de la mitad de los pacientes diabéticos estudiados presentaron al menos uno de los dos

Tabla 4. Expresión de citoquinas en casos con DM1 y controles según genotipos GG o AA del gen *CTLA-4*

Citoquina	Genotipo <i>CTLA-4</i>	Casos (n =15)	Controles (n =15)
IL-1β	AA	ND	ND
IL-1β	GG	ND	ND
IL-1α	AA	ND	ND
IL-1α	GG	ND	ND
IL-2	AA	Baja expresión	ND
IL-2	GG	Alta expresión	Baja expresión
IL-4	AA	Alta expresión	Baja expresión
IL-4	GG	ND	Baja expresión
IL-5	AA	ND	Baja expresión
IL-5	GG	ND	Baja expresión
IL-6	AA	ND	Baja expresión
IL-6	GG	ND	Baja expresión
IL-10	AA	ND	ND
IL-10	GG	Alta expresión	ND
TNF-α	AA	Alta expresión	Baja expresión
TNF-α	GG	Alta expresión	Baja expresión
TNF-β	AA	Baja expresión	Baja expresión
TNF-β	GG	Baja expresión	Baja expresión
INF-γ	AA	Baja expresión	Baja expresión
INF-γ	GG	Alta expresión	Baja expresión
TGF-β1	AA	Alta expresión	Alta expresión
TGF-β1	GG	Baja expresión	Alta expresión
TGF-β3	AA	ND	ND
TGF-β3	GG	ND	ND
Leptina	AA	Baja expresión	Baja expresión
Leptina	GG	Baja expresión	Alta expresión

anticuerpos cuantificados (anti-GAD65 y anti-IA-2), mientras que en el grupo control la presencia de dichos anticuerpos fue prácticamente nula. Estos resultados no son sorprendentes ya que se conoce hace más de 10 años que la presencia de anti-GAD65 y anti-IA2 se encuentra elevada en aproximadamente 75% de los pacientes con debut reciente de DM1. Una interesante materia de estudio correspondió a la asociación que tiene la presencia de estos anticuerpos con los genotipos específicos del gen *CTLA-4*. Nuestros resultados mostraron una mayor frecuencia de los anticuerpos anti-GAD65 y anti-IA-2 en los pacientes portadores del genotipo GG, indicando que este genotipo podría estar condicionando una respuesta autoinmune más severa. Nuestra observación es concordante con estudios previos que han muestra-

do un fenómeno similar; la presencia del alelo G se ha relacionado a una edad más temprana de debut y con mayor presencia de autoanticuerpos GAD65 e ICA512²⁷⁻³⁰.

Existe evidencia a través de experimentos “*in vitro*” con células Cos1 que indican que la presencia del alelo G se correlaciona con una disminución de ~30% en la densidad de *CTLA-4* en la superficie celular en comparación con aquellas células que presentan en su genoma el alelo A, de este modo, se postula que una disminución de *CTLA-4* en la superficie del linfocito T, generaría un menor control sobre su proliferación y una mayor producción de citoquinas³⁷⁻³⁸.

En este contexto, el segundo estudio presentado, estuvo enfocado en describir el ambiente inmunológico presente en los pacientes con DM1

y niños controles de acuerdo a las características genotípicas del gen *CTLA-4*. Este ensayo de expresión serológica de citoquinas usando un ELISA simultáneo, confirmó algunas tendencias interesantes al analizar los datos de acuerdo a la carga genotípica de los pacientes y controles. De esta manera, se observó que la presencia del genotipo GG concentró una mayor expresión de citoquinas que aportarían daño a la célula β (IL-2, INF γ y TNF α , producidas por linfocitos Th1) y una menor expresión de citoquinas en teoría protectoras como el caso de IL-4 y TGF β . Una posible explicación a estos resultados estaría dada por la ocurrencia de un desbalance en la proporción de linfocitos Th1 y Th2 generado probablemente por la presencia del alelo G en homocigosis. Existe evidencia en ratones KO para la molécula *CTLA-4* que indican una mayor diferenciación hacia una respuesta Th2³⁹, mientras que experimentos con bloqueadores de *CTLA-4* generan una polarización de linfocitos Th1⁴⁰, datos que indican que un desbalance tanto hacia una respuesta Th1 o Th2 es igualmente dañina para la inmunotolerancia. Es posible que el alelo G participe en una cadena de

eventos ligados a citoquinas específicas, así por lo menos lo muestra el análisis simultáneo de citoquinas realizado, donde existiría un desequilibrio entre “fenotipos alérgicos” (Th2) o “fenotipos tolerantes” (Th1). Una mayor expresión de IL-10 posiblemente estimule el fenotipo alérgico en los DM1 y una mayor expresión de células del tipo Th3 (TGF β 1) estimule la presentación de un fenotipo más tolerante. El papel de CTLA-4 ha sido evidenciado desde la perspectiva clínica en la DM1 en varios estudios, con asociaciones ligadas a un debut más prematuro, perfil variado de citoquinas y muy recientemente a diferencias entre diabetes fulminante y diabetes 1A⁴¹⁻⁴². Lo anterior, es concordante con nuestros resultados que muestran que este tipo de asociaciones podrían estar relacionadas a la presencia de genotipos específicos en el gen de *CTLA-4*.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de todos los niños y sus familias participantes en este estudio. A los Hospitales San Juan de Dios, San Borja-Arriarán y a la Fundación de Diabetes Juvenil de Chile.

REFERENCIAS

1. 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.
2. PEARCE SHS, MERRIMAN TR. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. *TRENDS Mol Med* 2006; 12: 90-8.
3. BARKER JM. Type 1 diabetes-associated: autoimmunity: natural history, genetic associations and screening. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1210-7.
4. PUGLIESE A. Genetics of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004; 33: 1-16.
5. MAIER LM, WICKER LS. Genetic susceptibility of type 1 diabetes. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 601-8.
6. KIM MS, POLYCHRONAKOS C. Immunogenetics of type 1 diabetes. *Horm Res* 2005; 64: 180-8.
7. BACH JF. Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2005; 25: 74-80.
8. HYOTY H. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann Med* 2002; 34: 138-47.
9. 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.
10. GREGENSEN PK, BEHRENS TW. Genetics of autoimmune diseases-disorders of immune homeostasis. *Nat Rev* 2006; 7: 917-28.
11. VAIDYA B, PEARCE S. The emerging role of the *CTLA-4* gene in autoimmune endocrinopathies. *Euro J Endocrinol* 2004; 150: 619-26.
12. VAN DER MERWE PA, DAVIS SJ. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 659-84.
13. TEFT W, KIRCHHOF M, MADRENAS J. A molecular perspective of *CTLA-4* function. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 65-97.
14. ZHOU Y, HUANG D, PARIS P, SAUTER CS, PROCK CA, HOFFMAN GS. An analysis of *CTLA-4* and proinflammatory cytokine genes in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2645-50.
15. BLOMHOF A, LIE BA, MYHRE AG, KEMP EH, WEETMAN AP, AKSELSEN HE ET AL. Polymorphisms in the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene region confer susceptibility to Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3474-6.
16. TAKARA M, KOMIYA I, KINJO Y, TOMOYOSE T, YAMASHIRO S, AKAMINE H ET AL. Association of *CTLA-4* gene A/G polymorphism in Japanese type 1 diabetic patients with younger age of onset and autoimmune thyroid disease. *Diabetes Care* 2000; 23: 975-8.
17. VAN BELZEN MJ, MULDER CJ, ZHERNAKOVA A, PEARSON PL, HOUWEN RH, WIJENGA C ET AL. *CTLA-4* +49 A/G and CT60 polymorphisms in Dutch coeliac disease patients. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 782-5.

18. MARRON MP, RAFFEL LJ, GARCHON HJ, JACOB CO, SERRANO-RIOS M, MARTÍNEZ-LARRAD MT ET AL. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with *CTLA-4* polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1275-82.
19. VAN DER AUWERA BJ, VANDEWALLE CL, SCHUIT FC, WINNOCK F, DE LEEUW IH, VAN IMSCHOOT S ET AL. *CTLA-4* gene polymorphism confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) independently from age and from other genetic or immune disease markers. The Belgian Diabetes Registry. *Clin Exp Immunol* 1997; 110: 98-103.
20. LEE YJ, HUANG FY, LO FS, WANG WC, HSU CH, KAO HA ET AL. Association of *CTLA-4* gene A-G polymorphism with type 1 diabetes in Chinese children. *Clin Endocrinol* 2000; 52: 153-7.
21. CHRISTIAKOV D, SAVOSTANOV K, NOSIKOV V. *CTLA-4* gene polymorphism are associated with, and linked to, insulin-dependent diabetes mellitus in a Russian population. *BMC Genetics* 2001; 2: 6-11.
22. KROKOWSKI M, BODALSKI J, BRATEK A, MACHEJKO P, CAILLAT-SUCKMAN S. *CTLA-4* gene polymorphism is associated with predisposition to IDDM in a population from central Poland. *Diabetes Metab* 1998; 24: 241-3.
23. GENÇ S, GENÇ K, SERCAN O, KISILDAG S, GULAY Z, ATAY T ET AL. Analysis of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (*CTLA-4*) exon 1 polymorphism in patients with type 1 diabetes mellitus in a Turkish population. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004; 17: 731.
24. LIANG H, YAGI K, ASANO A, KOBAYASHI J, MABUCHI H. Association between *CTLA-4* +49A/G polymorphism and type 1B diabetes in Japanese population. *Endocrine* 2004; 25: 105-10.
25. YANAGAWA T, MARUYAMA T, GOMI K, TANIYAMA M, KASUGA A, OSAWA Y ET AL. Lack of association between *CTLA-4* gene polymorphism and IDDM in Japanese subjects. *Autoimmunity* 1999; 29: 53-6.
26. MOCHIZUKI M, AMEMIA S, KOBAYASHI K, KABAYASHI K, SHIMURA Y, ISHIHARA T 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: 843-7.
27. ABE T, TAKINO H, YAMASAKI H, SERA Y, KONDO H, SAKAMAKI H ET AL. *CTLA-4* gene polymorphism correlates with the mode of onset and presence of ICA512 Ab in Japanese type 1 diabetes. *Diab Res Clin Pract* 1999; 46: 169-75.
28. ZALLOUA PA, ABCHEE A, SHBAKLO H, ZREIK TG, TERWEDOW H, HALABY G ET AL. Patients with early onset of type 1 diabetes have significantly higher GG genotype at position 49 of the *CTLA-4* gene. *Hum Immunol* 2004; 65: 719-24.
29. HAYASHI H, KUSAKA I, NAGASAKA S, KAWAKAMI A, ROKKAKU K, NAKAMURA T ET AL. Association of *CTLA-4* polymorphism with positive anti-GAD antibody in Japanese subjects with type 1 diabetes mellitus. *Clin Endocrinol* 1999; 51: 793-9.
30. KIKUOKA N, SUGIHARA S, YANAGAWA T, IKEZAKI A, KIM HS, MATSUOKA H ET AL. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene polymorphism confers susceptibility to type 1 diabetes in Japanese children: analysis of association with HLA genotypes and autoantibodies. *Clin Endocrinol* 2001; 55: 597-603.
31. UEDA H, HOWSON JM, ESPOSITO L, HEWARD J, SNOOK H, CHAMBERLAIN G ET AL. Association of the T-cell regulatory gene *CTLA-4* with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423: 506-11.
32. JAGO CB, YATES J, CAMARA NO, LECHLER RI, LOMBARDI G. Differential expression of *CTLA-4* among T cell subsets. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 463-71.
33. CNOP M, WELSH N, JONAS JC, JORNS A, LENZEN S, EIZIRIK DL. Mechanism of pancreatic β cell death in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: S97-S107.
34. BRESSON D, VON HERRATH M. Moving towards efficient therapies in type 1 diabetes: to combine or not to combine. *Autoimmunity Rev* 2007; 6: 315-22.
35. BINGLEY PJ, BONIFACIO E, MUELLER PW. Diabetes Antibody Standardization Program: first assay proficiency evaluation. *Diabetes* 2003; 52: 1128-36.
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. ANJOS S, POLYCHRONAKOS C. Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes: beyond HLA. *Mol Gen Metab* 2004; 81: 187-95.
38. ANJOS S, NGUYEN H, OUNISSI-BENKALHA H, TESSIER MC, POLYCHRONAKOS C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 result in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem* 2002; 277: 46478-86.
39. KHATTRI R, AUGER JA, GRIFFIN MD, SHARPE AH, BLUESTONE JA. Lymphoproliferative disorder in *CTLA-4* knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. *J Immunol* 1999; 162: 5784-91.
40. ANDERSON DE, BIEGANOWSKA KD, BAR-OR A, OLIVEIRA EM, CARREÑO B, COLLINS M ET AL. Paradoxical inhibition of T-cell function in response to *CTLA-4* blockade; heterogeneity within the human T-cell population. *Nat Med* 2000; 6: 211-4.
41. JONSON CO, LERNMARK A, LUDVIGSSON J, RUTLEDGE EA, HINKKANEN A, FARESEJO M. The importance of *CTLA-4* polymorphism and human leukocyte antigen genotype for the induction of diabetes-associated cytokine response in healthy school children. *Pediatric Diab* 2007; 8: 185-92.
42. KAWASAKI E, IMAGAWA A, MAKINO H, UGA M, ABIRU N, HANAFUSA T ET AL. Differences in the contribution of *CTLA-4* gene to susceptibility to fulminant and type 1A diabetes in Japanese. *Diabetes Care* 2008; 31: 1608-10.