

Imunogenética da Diabetes Tipo I

Carlos Penha Gonçalves

Instituto Gulbenkian de Ciência

Resumo

A diabetes tipo I (DTI) é a terceira doença crónica infantil mais prevalente, afectando em algumas populações 0,4% das crianças. A vasta maioria dos casos de DTI resulta do processo autoimune que conduz à destruição das células β do pâncreas, fenómeno complexo influenciado por múltiplos factores genéticos e ambientais. O factor genético com maior impacto na susceptibilidade à DTI é o complexo maior de histocompatibilidade (CMH) através de haplótipos de protecção e de predisposição. Outros factores genéticos importantes mas com efeitos bastante mais modestos têm sido associados à DTI como sejam os genes insulina, PTPN22 e CTLA-4. Detectar e confirmar a associação destes e outros genes à DTI constitui apenas um passo de uma estratégia mais abrangente que inclui a identificação das variantes alélicas que conferem susceptibilidade à doença e a determinação das consequências biológicas que lhes estão associadas. A identificação e estudo dos factores genéticos que conferem susceptibilidade à DTI têm contribuído para desvendar a génese de outras doenças autoimunes. Espera-se que esta investigação conduza a uma melhor compreensão da fiso-patologia da DTI e à identificação de genótipos que controlam mecanismos moleculares e celulares passíveis de constituir alvos de intervenções terapêuticas e preventivas.

Abstract

Diabetes type I (DTI) is the third more prevalent paediatric chronic disease, affecting in certain populations 0,4% of the children. The vast majority of DTI cases results from an autoimmune process that leads to the destruction of the pancreas beta cells, a complex phenomena influenced by multiple genetic and environmental factors. The genetic factor with most impact in the susceptibility to DTI is de major complex of histocompatibility (MCH) through protection and predisposition haplotypes. Other important, but with more modest effects, genetic factors associated to DTI are the insulin, PTPN22 and CTLA-4 genes. Detecting and confirming the association of these and other genes to DTI represents only a step in a more encompassing strategy that includes the identification of the allelic variants that give susceptibility to the illness and the determination of the associated biological consequences. The identification and the study of the genetic factors that give susceptibility to DTI have contributed to reveal the genesis of other autoimmune diseases. It is expected that this type of research will lead to a better comprehension of the pathophysiology of DTI and to the identification of the genotypes that control molecular and cellular mechanisms that could constitute targets for therapeutic and preventive interventions.

ETIOLOGIA

A diabetes tipo I (DTI) é uma doença que resulta da destruição autoimune das células β , produtoras de insulina nos ilhéus de Langerhans pancreáticos. As causas da doença estão ainda por esclarecer e múltiplos factores têm sido propostos, uns predispondo, outros prevenindo o desenvolvimento da doença. Estudos genéticos em famílias e em gémeos mostram que a diabetes tipo I é geneticamente determinada. A observação de que há famílias mais afectadas do que outras, poderá dever-se quer à partilha de factores genéticos como de ambientais, pelo que estudos em gémeos são úteis para determinar a natureza etiológica da doença. A baixa taxa de concordância da doença em gémeos homozigóticos (40-50%) permite inferir a existência de factores ambientais que influenciam o desenvolvimento da doença (Kyvik *et al.*, 1995). Por outro lado, em gémeos dizigóticos a taxa de concordância é semelhante à frequência da doença entre irmãos (5-10%), sendo por outro lado cerca de 15 vezes superior à prevalência da doença na população em geral (0,2-0,4%) (Hirshhorn *et al.*, 2003). Esta análise é congruente com a presença de um componente genético na DTI e sugere que os factores de susceptibilidade genética explicam cerca de 50% do risco de desenvolver esta doença, conferindo um risco genético (λ_s) 15 vezes superior em relação à população normal (Pociot *et al.*, 2002). Assim, a DTI é uma doença multi-factorial em que o risco de contrair doença está fraccionado em factores genéticos e não genéticos.

EPIDEMIOLOGIA

A incidência da diabetes tipo I tem aumentado consideravelmente nas últimas três décadas em diversas populações e actualmente afecta 0,4% da população europeia. As razões subjacentes a este aumento de incidência não estão determinadas. Contudo, tem ganho peso a hipótese de um aumento da penetrância de alelos de susceptibilidade à diabetes, como resultado de alterações em factores ambientais (Group, E. A. S., 2000). Por outro lado, a introdução da terapêutica com insulina na década de 1930, resultou no aumento do número de indivíduos portadores de configurações genéticas de susceptibilidade, o que também pode trazer uma contribuição para o aumento da incidência da doença. Nos países em desenvolvimento e nas áreas rurais a incidência de doenças autoimunes, incluindo a DTI é significativamente mais baixa do que nos países desenvolvidos e nas áreas industrializadas (Group, E. A. S., 2000). De facto, pode observar-se um gradiente Norte-Sul em que a incidência de DTI decresce de Norte para Sul no hemisfério Norte e, de Sul para Norte no hemisfério Sul. Além disso, foi sugerido que em populações emigradas a incidência da doença é mais semelhante à do país de acolhimento do que a do país de origem (Bodansky *et al.*, 1992). Estas observações incorporam a “hipótese de higiene” segundo a qual as infecções nos primeiros anos de vida desempenham um papel protector na prevenção das doenças autoimunes e postulando que o principal factor para o aumento da incidência das doenças autoimunes é a redução da incidência das doenças infec-

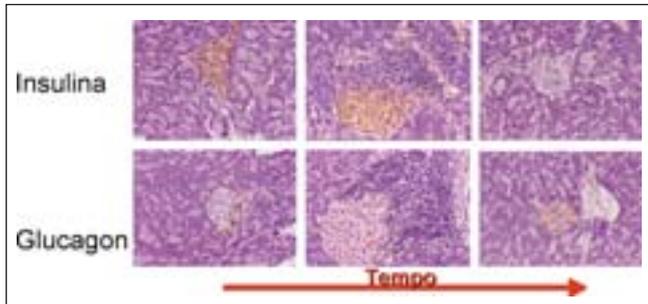


Figura 1 - Evolução e especificidade do processo insulítico, demonstrando que o infiltrado linfocitário leva à completa destruição das células produtoras de insulina (coradas a castanho por imunohistoquímica no painel superior) deixando intactas células produtoras de glucagon (coradas a castanho por imunohistoquímica no painel inferior).

ciosas nos países desenvolvidos. De facto, modelos animais que desenvolvem espontaneamente diabetes tipo I como é o caso do ratinho “Non Obese Diabetic” (NOD), mostram que a doença pode ser prevenida por infecção deliberada por vírus (Oldstone, *et al.*, 1990), bactérias (Martins *et al.*, 1999) ou helmintes (Cooke *et al.*, 1999).

INFLUÊNCIAS AMBIENTAIS

Os estudos epidemiológicos que ao longo das últimas décadas evidenciam aumentos drásticos da incidência da DTI, têm motivado a investigação sobre factores ambientais com papel diabetogénico, mas pouco se sabe sobre a sua natureza específica. Os vírus e os factores nutricionais, como a proteína do leite de vaca, foram indiciados como factores desencadeantes da DTI, mas na sua maior parte estas observações não têm sido confirmadas por estudos ulteriores. Apesar da controvérsia existente, é possível que a exposição a antígenos virais específicos e/ou a superantígenos possa provocar a activação de células T por reactividade cruzada com auto-antígenos (fenómeno conhecido por mimetismo molecular) conduzindo ao início da doença autoimune em indivíduos geneticamente susceptíveis. Assim, a identificação de factores não hereditários permanece um desafio e constituirá um elemento importante para a compreensão da sua interacção com os factores genéticos e para o esclarecimento da etiologia da diabetes tipo I.

IMUNO-PATOGÉNESE

O processo autoimune, que na diabetes tipo I leva à destruição específica das células β produtoras de insulina nos ilhéus de Langerhans pancreáticos, resulta da intervenção de múltiplos componentes. Assim, as células B produzem auto-anticorpos para antígenos presentes nas células β . Por sua vez, estes auto-antígenos são captados e processados por células apresentadoras de antígenos (APC) tais como, células dendríticas, macrófagos ou mesmo células B que migram para os gânglios linfáticos. No microambiente dos gânglios linfáticos, as APC apresentam os auto-antígenos a células T auto-activas que sofrem activação e expansão clonal e migram para o pâncreas, onde são capazes de atacar especificamente

as células β dos ilhéus pancreáticos (Mandrup-Poulsen, 2003). O processo de invasão por células mononucleares que ocorre nos ilhéus de Langerhans pancreáticos, e que resulta numa reacção inflamatória denominada insulite (Figura 1), conduz à destruição da massa de células β pancreáticas (Cnop *et al.*, 2005). Não são claras as causas desta desregulação autoimune na DTI mas é provável que os factores patogénicos actuem a diferentes níveis alterando os mecanismos de indução e manutenção da tolerância imunológica. Assim, o estudo da etiopatogenia das doenças autoimunes tem-se centrado na investigação de anomalias manifestadas durante o desenvolvimento dos repertórios imunológicos nos órgãos linfoides primários e da regulação da activação linfocitária na periferia.

Tolerância Central

Os mecanismos de selecção tímica têm sido intensamente investigados na procura de anomalias que justifiquem o desenvolvimento e maturação das células T envolvidas no ataque autoimune às células β na DTI. De facto, no ratinho NOD a peculiaridade da morfologia do epitélio tímico, as alterações da dinâmica da selecção tímica e sobretudo a presença de moléculas do complexo de maior histocompatibilidade (CMH) que predispoem à doença, poderão ser responsáveis por desvios nos mecanismos tímicos de indução de tolerância central constituindo provavelmente componentes cruciais do processo diabetogénico.

A estrutura das moléculas do CMH pode condicionar os limiares de afinidade para a selecção tímica se a estabilidade da sua ligação a péptidos estiver afectada. Estes condicionamentos estruturais podem estar na origem da forte associação do locus CMH a muitas doenças autoimunes. A eficácia da selecção tímica pode também ser afectada por alterações de sensibilidade dos timocitos à indução de apoptose. A resistência a sinais de delecção no timo do ratinho NOD foi descrita em vários sistemas experimentais que representam sinais de selecção positiva (Penha Gonçalves *et al.*, 1995; Bergman *et al.*, 2001a) e negativa (Kishimoto *et al.*, 2001; Lesage *et al.*, 2002) ou de expansão homeostática (Bergman *et al.*, 2001b). A resistência dos timocitos NOD aos sinais de apoptose poderão representar diferentes anomalias genéticas que se manifestam na incapacidade de induzir a expressão de proteínas pró-apoptóticas, como por exemplo a proteína Bim, durante a estimulação antigénica no timo (Liston *et al.*, 2004).

Tolerância Periférica

Apesar da eficácia dos mecanismos centrais de indução de tolerância, existem células auto-activas no sistema imune periférico de indivíduos saudáveis que podem dar origem a reacções autoimunes, o que indica que normalmente estas células são mantidas sob controlo na periferia (Romball *et al.*, 1984; Whiteley *et al.*, 1990). Os mecanismos periféricos de indução de tolerância incluem a delecção de células auto-activas activadas ou a sua supressão funcional por células T reguladoras (Van Parijs *et al.*, 1998).

De facto, os defeitos nos mecanismos de indução de apoptose dos linfócitos periféricos que observámos nos linfócitos dos ratinhos NOD (Colucci *et al.*, 1997) poderão ter um papel relevante na evasão a estes mecanismos tolerogénicos. Estas observações têm paralelo em estudos realizados em doentes com DTI, sublinhando a importância da resistência dos linfócitos periféricos à apoptose como mecanismo patogénico na doença autoimune (Giordano *et al.*, 1995; Dosch *et al.*, 1999).

Por outro lado, a activação das células T do ratinho NOD parece ocorrer em condições de co-estimulação sub-ótima. Na verdade, as moléculas das vias de co-estimulação como CD28 e CTLA4 (Colucci *et al.*, 1997) são expressas a baixos níveis nas células T do ratinho NOD, e as moléculas co-estimuladoras Icos (Herman *et al.*, 2004) e PD-1 (Ansari *et al.*, 2003) demonstraram ser capazes de interferir com o decurso do processo diabético.

Nos últimos anos, a intensa investigação sobre as funções imunoreguladoras tem contribuído para a noção de que as células T reguladoras estão comprometidas nas doenças autoimunes. As diferentes sub-populações fenotípicas de células T com propriedades reguladoras foram escrutinadas no ratinho NOD, nomeadamente as células T CD4⁺ CD25⁺ e as células TCR $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ Nk1.1⁺ (células NKT). A população de células NKT no ratinho NOD parece estar reduzida 2 a 4 vezes (Baxter *et al.*, 1997) e estas células revelaram um efeito protector da diabetes em experiências de reconstituição por transferência celular (Hammond *et al.*, 1998; Lehuen *et al.*, 1998) ou por transgénese (Duarte *et al.*, 2004). Quando comparados com estirpes normais, os ratinhos NOD prediabéticos têm menor população de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ (Salomon *et al.*, 2000) e estas células demonstraram ser capazes de prevenir manifestações autoimunes em experiências de transferência celular (Chen *et al.*, 2003). Em consonância, estudos comparando doentes de DTI com controlos saudáveis mostram um decréscimo das funções reguladoras das células CD4⁺CD25⁺ nos indivíduos doentes e uma sensibilidade particular destas células para a apoptose espontânea em indivíduos com diabetes de início recente ou em familiares em risco de doença (Lindley *et al.*, 2005; Glisic-Milosavljevic *et al.*, 2007).

As funções de imunoregulação podem ser mediadas por citocinas, o que constitui um importante mecanismo de modulação da actividade linfocitária. Células T “naive” podem ser activadas por citocinas segregadas por células do sistema imune inato em fases precoces da resposta imune. Estas citocinas têm a capacidade de estimular diferentes mecanismos efectores mediados pelas células T e de polarizar as células CD4⁺ para reposta tipo Th1 ou Th2. A influência das citocinas no desenvolvimento da DTI foi intensamente estudada no ratinho NOD e foi sugerido que a progressão de insulite para diabetes poderá ser promovida por desequilíbrios entre citocinas (Charlton *et al.*, 1995; Liblau *et al.*, 1995). A análise da expressão de citocinas nos infiltrados pancreáticos mostrou que as citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IFN α and TNF α) e de tipo 1 (IFN γ , TNF β , IL-2 and IL-12) podem estimular a destruição das células β enquanto as

citocinas de tipo 2 (IL-4 and IL-10) e tipo 3 (TGF β) têm um papel inibidor. Contudo, algumas experiências têm demonstrado que a administração de IL-1, IL-2 e TNF β levaram a um decréscimo de diabetes enquanto que a expressão intralilheus da citocina anti-inflamatória IL-10 teve um efeito de aceleração da diabetes. Estes efeitos contraditórios revelam que os mecanismos pelos quais as citocinas podem influenciar o curso da doença necessita de melhor clarificação e que a relevância dos desequilíbrios de citocinas na DTI não estão suficientemente elucidados.

Células B e Auto-anticorpos

Apesar da DTI ser mediada por células T, o compartimento B parece estar comprometido e há evidências de que as células B têm um papel acelerador da doença no ratinho NOD e de que os auto-anticorpos característicos da doença podem ter um papel de amplificação nos estádios iniciais do processo autoimune. Na DTI, os auto-antígenos conhecidos incluem a insulina, a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65) e antígenos dos ilhéus de Langerhans como o antígeno insulinoma 2 que representa a fosfatase 512 (IA-2 - *insulinoma-antigen 2*). Os anticorpos anti-insulina são marcadores úteis da gravidade da doença, quando detectados antes do tratamento com insulina. Os anticorpos anti-GAD65 são os que persistem mais tempo após o diagnóstico e podem ser úteis para confirmar a etiologia autoimune em casos de evolução prolongada. Sinais de auto-reactividade contra as células β , na forma de auto-anticorpos circulantes ou revelados por disfunções das células β pancreáticas, ocorrem anos antes do aparecimento de manifestações clínicas de diabetes tipo 1. Vários estudos têm demonstrado correlações entre presença de auto-anticorpos e alelos HLA, sugerindo que o genótipo HLA pode ter um efeito determinante na geração de auto-anticorpos contra auto-antígenos específicos na diabetes tipo 1. Em suma, o processo autoimune na DTI parece envolver a geração de células T auto-reactivas, a função das células T reguladoras no controlo da auto-agressão, as funções de apresentação de antígeno e os mecanismos de produção de auto-anticorpos. A dissecção destes componentes patogénicos poderá ser facilitada se a eles forem associados factores genéticos que se sabe contribuir para a DTI. A investigação de correlações entre imuno-fenótipos e factores genéticos de susceptibilidade à diabetes, em que o laboratório do Dr. Dan Holmberg foi pioneiro, foi seguida por muitos investigadores como forma de evidenciar a relevância dos processos biológicos acima mencionados na patogénese da DTI.

FACTORES GENÉTICOS

Susceptibilidade Genética

A quebra abrupta do risco familiar de contrair a doença à medida que diminui o grau de parentesco com um doente DTI, sugere que o componente genético da doença depende da herança combinada de múltiplos factores genéticos,

em que o efeito de cada *locus* será relativamente reduzido. Por esta razão e apesar de alguns genes envolvidos na DTI serem já conhecidos a identidade da maior parte dos genes envolvidos na susceptibilidade genética à doença permanece desconhecida.

A investigação dos factores genéticos da DTI foi iniciada por estudos de mapeamento genético em que a localização genómica dos loci de susceptibilidade é estabelecida através da identificação de regiões que são partilhadas por pares de irmãos diabéticos numa frequência mais alta do que os esperados 50%. Esta abordagem posicional permitiu identificar dezoito *loci* de susceptibilidade à diabetes, designados IDDM1 a IDDM18 (Davies *et al.*, 1994). Contudo, devido à falta de poder estatístico destes estudos alguns *loci* IDDM são hoje considerados como artefactos estatísticos (Cox *et al.*, 2001). O estudo detalhado de alguns IDDM *loci* tem levado à identificação de genes considerados candidatos a participarem na etiopatogenia da DTI. Este genes candidatos são testados para confirmar a sua associação à DTI, avaliando se polimorfismos genéticos nessas regiões génicas têm diferentes frequências alélicas em doentes DTI quando comparados com controlos. Até hoje, todos os genes em que foi confirmada uma associação genética à DTI foram identificados pela abordagem de genes candidatos funcionais. Contudo, esta abordagem exige um conhecimento prévio da função dos genes a estudar e sobre o seu possível envolvimento na patogénese da doença.

Complexo de Histocompatibilidade Maior

O primeiro *locus* candidato estudado e associado à DTI foi a região *Human Leucocyte Antigen* (HLA) no cromossoma 6p21.3 e é designado IDDM1. Este *locus* constitui o principal factor genético de risco para a diabetes tipo I, conferindo 40 a 50% do risco hereditário da doença. O HLA representa um grupo de genes codificando para proteínas de superfície divididas na classe I (A, B, C) e classe II (DP,DQ,DR). O alto grau de polimorfismo genético destas proteínas não tem paralelo nas populações humanas.

Estudos genéticos revelaram que a região II tem uma contribuição significativa para a susceptibilidade à DTI, atribuível sobretudo aos genes DR e DQ. Contudo, é difícil avaliar a importância relativa de cada gene e detectar pequenos efeitos de outros genes nesta região devido ao pronunciado efeito de “linkage desequilibrium”. Assim, estudos genéticos em caucasianos demonstraram que o haplótipo DQB1*0302-A1*0301 (DQ8) confere o risco mais elevado, com um efeito diabotogénico aditivo se o alelo DRB1*0401 (DR4) for herdado como parte do haplótipo. Cerca de 40% dos doentes de DTI recém-diagnosticados têm um maior risco genético conferido pela combinação genotípica DQB1*0301-A1*0301/DQB1*0201-A1*0501 (DQ8/DQ2) que, por outro lado está presente em apenas 3% da população normal. Por causa do efeito de “linkage desequilibrium” este genótipo quase sempre implica a heterozigotia DR4/DR3 (Quadro I). Em contraste, outros alelos têm sido descritos como factores de associação negativa (efeito protector) para a diabetes tipo I, como é

Quadro I - Risco genético conferido por combinações diferentes haplotípicas dos genes DR e DQ e respectiva frequência em populações caucasianas.

Risco genético	HLA-DR	DQBI	Frequência (%)
Alto (1:15)	3/4	0201/0302	2.4
Moderado (1:60-1:200)	4/x	0302/x	12.7
	4/4	0302/x	3.0
Baixo (1:300)	3/3	0201/0201	1.4
	3/x	0201/X	12.5
	3/4	0201/não 03	

o caso do haplótipo DR1*1505-DQB1*0602-A1*0102 (DQ6) que está presente em menos de 1% dos doentes diabéticos mas em aproximadamente 20% da população normal (Pugliese *et al.*, 1995).

Ao nível molecular, os alelos de risco para DTI contêm polimorfismos não-sinónimos nos exões 2 da cadeia α da molécula DR e das cadeias α e β da molécula DQ. O polimorfismo mais característico é a ausência de ácido aspártico na posição 57 da cadeia β da molécula DQ. O papel do Complexo de Histocompatibilidade Maior (CHM) foi intensamente investigado em modelos animais. No ratinho NOD também se encontra um polimorfismo no exão 2 da cadeia β da molécula A da classe II do ratinho (ortóloga de DQ), que codifica para um aminoácido não-aspártico (serina) na posição 57 (Acha-Orbea *et al.*, 1987). Os alelos do CHM de estirpes resistentes à diabetes conferem total protecção à estirpe NOD, e têm sido colhidas evidências de que os genes das classes II do CHM são ineficientes na indução da tolerância imunológica central e periférica. Nestas condições, a contribuição do CHM para o ataque imunológico às células β do pâncreas poderia ser potenciada pela presença de anomalias em outras funções imunológicas conferidas por outros factores genéticos.

Loci Externos ao CHM

Os haplótipos HLA que conferem alto risco de DTI ocorrem na população geral em frequência apreciável, mas apenas uma fracção destes indivíduos desenvolve a doença. Por outro lado, 25% dos irmãos de doentes diabéticos não partilham o haplótipo HLA de risco do irmão doente. Ainda assim, estes indivíduos têm um risco de desenvolver DTI sete vezes superior ao da população geral. Uma vez que o risco genético da DTI é aproximadamente 16, infere-se que o *locus* HLA explicará cerca de 40 a 50% do risco genético na DTI. Assim, a identificação de factores genéticos não-HLA, que poderão ter efeitos individuais reduzidos, será importante para a compreensão da patogénese da DTI. Três *loci* não-HLA de susceptibilidade à DTI foram estabelecidos com base no seu efeito directo sobre o risco de doença, o *locus* insulina com um *odds ratio* de 1,9, o *locus* CTLA4 com *odds ratio* 1,2 e o *locus* PTPN22 com *odds ratio* de 1,8 (Quadro II). Contudo, os *loci* responsáveis por uma significativa fracção da agregação familiar na diabetes tipo I continua por identificar.

Locus Insulina

O gene da insulina mapeia dentro do *locus* IDDM2 no cromossoma 11p15.5 que é representado por polimorfismos genéticos na região promotora do gene da insulina (INS) que foi repetidamente associado à DTI. Este polimorfismo consiste na variação do número de repetições em tandem (VNTR, ou minisatélite) de um motivo nucleotídico de 14bp de DNA localizado 365bp a montante do início do gene INS (Figura 2). Este polimorfismo mostra uma distribuição bimodal com alelos entre as 30-60 repetições (classe I) ou alelos entre 120-170 repetições (classe III), sendo os alelos intermédios relativamente raros (classe II). Os alelos da classe III parecem ter um efeito protector dominante uma vez que o risco de contrair doença do portador de um destes alelos é 2-3 vezes inferior ao risco de um portador de dois alelos da classe I.

Pela sua localização a montante do promotor do gene INS os seus efeitos são provavelmente mediados pelos níveis de transcrição do gene associados aos diferentes alelos. De facto, parece ser a nível do timo, mais do que no pâncreas que o VNTR-INS exerce importantes efeitos biológicos. Os alelos que predis põem à DTI estão associados a um decréscimo de 2-3 vezes do nível de expressão do gene da insulina no timo. Se a presença de insulina no timo está ligada à indução de tolerância, então o decréscimo de expressão de insulina permitirá que células T que reconhecem auto-antígenos derivados da insulina possam escapar aos mecanismos de deleção.

Este *locus* de susceptibilidade parece não estar representado nos ratinhos NOD. No entanto, ratinhos NOD com construções genéticas que permitem expressar reduzidas quantidades de insulina no timo mostraram marcada aceleração do processo de insulite e diabetes.

Locus CTLA4

O gene CTLA4 codifica para uma proteína da superfamília das imunoglobulinas que é expressa especificamente nas células T após activação. O CTLA4 é um receptor que medeia um sinal de supressão de activação celular, em células T que estão em contacto com células apresentadoras de antígeno.

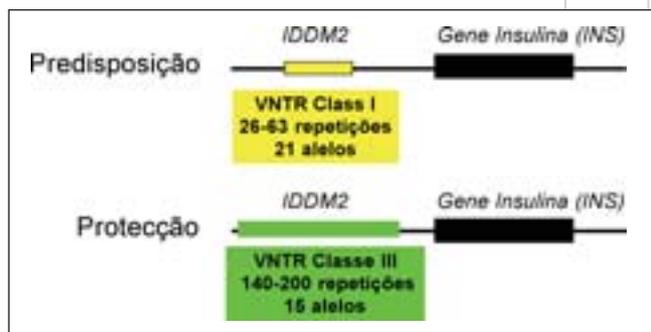


Figura 2 - A sequência repetida (VNTR) na região que regula a expressão do gene da insulina possui alelos com poucas repetições que conferem susceptibilidade à DTI e alelos com muitas repetições que conferem protecção (VNTR-Variable Number Tandem Repeat).

Quadro II - Localização, frequência alélica e risco conferido por polimorfismos genéticos nucleotídicos localizados no genes da insulina, CTLA4 e PTPN22.

Gene	Localização do SNP	Frequência alélica (%)	Odds ratio
Insulina	Região promotora	18,2	1.9
CTLA 4	Região 3'	42,7	1.2
PTPN22	Sustituição R260W	14,5	1.7

Este gene apresenta-se como um excelente candidato no controlo da autoimunidade mediada por células T devido ao seu envolvimento no controlo do estado de activação das células T e à sua relação com a apoptose induzida por activação, bem como pela sua expressão constitutiva na subpopulação de células T com funções imuno-reguladoras. A ablação deste gene em ratinhos mostra um exuberante fenómeno de infiltração linfocitária multi-orgânica.

O gene CTLA4 mapeia no cromossoma 2q33 dentro do *locus* IDDM2. A sua associação com DTI foi confirmada em múltiplos estudos. Polimorfismos mononucleotídicos (SNP) na região 5', no exão I e na região 3' deste gene foram associados não só à DTI mas também a outras doenças autoimunes como a doença de Graves e a tiroidite de Hashimoto. É possível que os polimorfismos na região 5' e no exão I estejam implicados na regulação da expressão do CTLA4 mas o papel dos polimorfismos na região 3' é mais especulativo podendo estar relacionado com a estabilidade do RNA mensageiro, com *splicing* alternativo ou com o mecanismo de poliadenilação. O papel deste *locus* no ratinho NOD foi evidenciado a propósito da resistência linfocitária à apoptose (Colucci *et al.*, 2007) (Figura 3) e foi identificado como o factor de susceptibilidade murina do *locus* Idd5.1. Diferentes polimorfismos neste gene têm sido associados à DTI e a outras doenças autoimunes, pelo que a molécula CTLA4 é tida como um componente central e geral da patogenia da autoimunidade (Ueda *et al.*, 2003, Einarsdottir *et al.*, 2003).

Locus PTPN22

O gene PTPN22 codifica a tirosina fosfatase de tipo não-receptor 22 que é específica de linfócitos. Esta proteína suprime a activação das células T defosforilando três quinases envolvidas na sinalização do sinal do receptor das células T e interagindo com a tirosina quinase C-terminal (Csk) que actua como supressora de quinases. A ablação do gene ortólogo de PTPN22 no ratinho leva a um aumento de células T de memória o que poderá acentuar fenómenos autoimunes. O gene PTPN22 mapeia no cromossoma 1p13.3-p13.1 e foi associado, em múltiplos estudos, à DTI através de um SNP que resulta numa substituição da arginina na posição 620 por triptofano. Esta substituição mostrou ser responsável no ratinho por perda de capacidade inibitória da sinalização pelo receptor das células T. No entanto, um número apreciável de SNPs mapeiam em forte "linkage desequilibrium" nesta

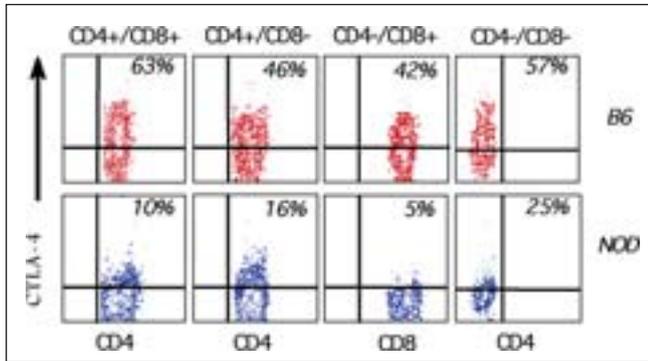


Figura 3 - Expressão do gene CTLA4 em células T do timo de ratinhos NOD em comparação a ratinhos da estirpe controlo C57Bl/6 (B6). Os perfis de citometria de fluxo mostram reduzida expressão nas principais populações tímicas do ratinho NOD.

região que contém mais seis genes, pelo que outros genes nesta região poderão contribuir para a associação genética evidenciada.

ARQUITECTURA GENÉTICA DA DIABETES TIPO I

A diabetes tipo I tem uma componente genética de natureza poligénica. Os factores genéticos até agora identificados apenas explicam uma fracção da susceptibilidade genética pelo que outros factores genéticos estarão ainda por identificar. No entanto, é provável que alguns dos factores genéticos mais relevantes para a DTI estejam entre os *loci* já identificados. O facto destes factores terem sido identificados por associação da doença a alelos que estão representados em alta frequência na população, permite a interpretação que se tratam de variantes genéticas cujo papel diabetogénico só é manifestado em contextos genéticos e ambientais de predisposição para a DTI.

Do estudo destes *loci* parece emergir um cenário em que alguns *loci* terão um papel de predisposição geral para autoimunidade enquanto outros parecem estar relacionados com fenótipos específicos da DTI. De facto, os alelos do gene CTLA4 e do gene PTPN22 que foram associados à DTI foram também associados a outras doenças autoimunes. Por isso, estes *loci* têm sido propostos como factores de susceptibilidade geral à autoimunidade (Einarsdottir *et al.*, 2003; Ueda *et al.*, 2003, Smyth *et al.*, 2004). Por coincidência, estes dois genes expressam-se especificamente nas células T e ambos estão relacionados com a regulação negativa da actividade das células T. Os alelos destes genes associados com as doenças autoimunes parecem conferir um deficiente controlo negativo da activação das células T. Emerge assim o conceito de que disfunções nos mecanismos intracelulares necessários à estrita limitação do estado de activação das células T são um factor geral de predisposição às doenças autoimunes.

Por outro lado, a determinação do fenótipo específico de cada doença será possivelmente conferido por outros factores genéticos. No caso da DTI, os alelos da insulina que foram associados à doença parecem ser um protótipo de um gene que determina o alvo do ataque imune, e cuja variabilidade

genética específica a susceptibilidade à DTI. É interessante verificar que os alelos associados à doença parecem não alterar a funções fisiológicas da insulina, mas estão associados à selecção tímica de células T reactivas à insulina.

Os haplótipos CHM reconhecidos como conferindo susceptibilidade à DTI não parecem ser referenciáveis como factores de susceptibilidade geral às doenças autoimunes. No entanto, é neste caso mais difícil definir o seu papel patogénico dadas as múltiplas funções das moléculas do CHM no sistema imune. Na verdade, até ao momento não foi possível distinguir se os alelos do CHM de susceptibilidade à DTI favorecerão as reactividades de células T típicas da DTI ou se pelo contrário contribuem com uma afinidade promiscua para uma gama de auto-antígenos que estão envolvidos em diferentes doenças autoimunes. No entanto, o facto de diferentes haplótipos de susceptibilidade conduzirem a diferentes padrões de auto-anticorpos nos doentes com DTI, bem como o facto de diferentes haplótipos do CHM murino, quando incluídos no mesmo fundo genético serem capazes de conferir diferentes fenótipos autoimunes, indicam que os alelos dos genes do CHM podem assumir um papel na especificação do fenótipos autoimunes.

Uma fracção significativa da componente genética da DTI ainda não está estudada e tem sido de difícil abordagem. Estudos de *linkage* genético em diferentes populações foram reprodutíveis na identificação de alguns *loci* como o CHM ou a região da insulina e CTLA4. Contudo, este não foi o caso para um número apreciável de *loci* IDDM que foram identificados apenas em certas populações. Apesar da falta de poder estatístico destes estudos poder justificar esta situação, os resultados também podem reflectir uma componente de heterogeneidade genética na DTI conferida por alguns destes *loci*.

Por outro lado, parte da susceptibilidade genética ainda não explicada poderá ser devida a factores genéticos que por efeitos muito reduzidos que não foram identificados nos estudos de *linkage* iniciais como foi o caso do gene candidato PTPN22. Nesta perspectiva, é interessante ressaltar o interesse de *loci* genéticos como a IL2 (Podolin *et al.*, 2000) e CD101 (Penha Gonçalves *et al.*, 2003) que foram identificados no ratinho NOD, mas cujas regiões ortólogas em humanos não foram referenciadas por estudos de *linkage*. Estes genes e os processos biológicos em que estão envolvidos poderão constituir futuros alvos da investigação genética em diabetes tipo I.

Assim, a progressiva elucidação do papel patogénico dos genes da DTI já conhecidos e a identificação de novos factores de susceptibilidade genética por certo reforçarão a noção de que a diabetes tipo I constitui um paradigma da genética das doenças autoimunes.

BIBLIOGRAFIA

- Acha-Orbea, H., and McDevitt, H. O. (1987). The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2435-9.
- Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, Smith RN, Yagita H, Akiba H, et al.,

- The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 2003;198:63 – 9.
- Baxter, A. G., Kinder, S. J., Hammond, K. J., Scollay, R., and Godfrey, D. I. Association between alpha/beta TCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 1997; 46, 572-82.
 - Bergman ML, Cilio CM, Penha-Goncalves C, Lamhamedi-Cheradi SE, Lofgren A, Colucci F, Lejon K, Garchon HJ, Holmberg D. CTLA-4-/- mice display T cell-apoptosis resistance resembling that ascribed to autoimmune prone non-obese diabetic (NOD) mice. *J Autoimmun.* 2001a; 16(2):105-13.
 - Bergman ML, Penha-Goncalves C, Lejon K, Holmberg D. Low rate of proliferation in immature thymocytes of the non-obese diabetic mouse maps to the Idd6 diabetes susceptibility region. *Diabetologia.* 2001b ;44(8):1054-61.
 - Bodansky, H. J., A. Staines, C. Stephenson, D. Haigh, and R. Cartwright. Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a trans migratory population. *Bmj* 1992; 304:1020.
 - Charlton, B., and Lafferty, K. J. The Th1/Th2 balance in autoimmunity. *Curr. Opin Immunol* 1995; 7, 793-8.
 - Chen C, Lee WH, Yun P, Snow P, Liu CP Induction of autoantigen-specific Th2 and Tr1 regulatory T cells and modulation of autoimmune diabetes. *J. Immunol* 2003;171: 733 – 44.
 - Colucci, F., Cilio, C.M., Lejon, K., Penha-Goncalves, C., Bergman, M-L, Holmberg, D. Programmed cell death in the pathogenesis of murine IDDM: Resistance to apoptosis induced in lymphocytes by cyclophosphamide. *J. Autoimmunity.* 1996; 9:271-276.
 - Colucci, F., Bergman, M-L, Penha-Goncalves, C., Cilio, C.M. and Holmberg, D. Apoptosis resistance of NOD peripheral lymphocytes linked to the Idd5 diabetes susceptibility region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94:8670-8674.
 - Cooke, A., P. Tonks, F. M. Jones, H. O'Shea, P. Hutchings, A. J. Fulford, and D. W. Dunne. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol* 1999; 21:169.
 - Cox NJ, Wapelhorst B, Morrison VA, Johnson L, Pinchuk, L, Spielman RS, Todd JA, Concannon P: Seven regions of the genome show evidence of linkage to type 1 diabetes in a consensus analysis of 767 multiplex families. *Am J Hum Genet* 2001; 69:820–830.
 - Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SCL, Jenkins SC, Palmer SM, Balfour KM, Rowe B, Farrall M, Barnett AH, Bain SC, Todd JA: A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994; 371: 130–136.
 - Dosch H, Cheung RK, Karges W, Pietropaolo M, Becker DJ. Persistent T cell anergy in human type 1 diabetes. *J Immunol.* 1999; 163: 6933–6940.
 - Duarte N, Stenstrom M, Campino S, Bergman ML, Lundholm M, Holmberg D, Cardell SL. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice mediated by CD1d-restricted nonclassical NKT cells. *J Immunol.* 2004; 1;173(5):3112-8.
 - Einarsdottir E, Soderstrom I, Lofgren-Burström A, Haraldsson S, Nilsson-Ardnor S, Penha-Goncalves C, Lind L, Holmgren G, Holmberg M, Asplund K, Holmberg D. The CTLA-4 locus as a general autoimmunity factor: An extended pedigree provides evidence for synergy with the HLA locus in the etiology of Type 1 Diabetes Mellitus, Hashimoto's Thyroiditis and Graves' disease. *Eur J. Hum. Genet.* 2003; 111, 81-4.
 - Giordano C, De Maria R, Stassi G, Todaro M, Richiusa. Defective expression of the apoptosis-inducing CD95 (Fas/AP APO-1) molecule on T and B cells in IDDM. *Diabetologia* 1995; 38: 1449–1454.
 - Glisic-Milosavljevic S, Waukau J, Jailwala P, Jana S, Khoo H-J, et al.,). At-Risk and Recent-Onset Type 1 Diabetic Subjects Have Increased Apoptosis in the CD4 CD4+CD25 CD25+high T-Cell Fraction. *PLoS ONE* 2007; 2: e146.
 - Group, E. A. S. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group. *Lancet* 2000; 355:873
 - Herman AE, Freeman GJ, Mathis D, Benoist C. CD4+ CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med* 2004;199: 1479 – 89
 - Hammond, K. J. L., Poulton, L. D., Palmisano, L. J., Silveira, P. A., Godfrey, D. I., and Baxter, A. G. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* 1998; 187, 1047-56.
 - Hirshhorn JN. Genetic epidemiology of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2003; 4:87–100
 - Kishimoto H, Sprent J. A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat Immunol* 2001; 2:1025 – 31.
 - Kyvik KO, Green A, Beck-Nielsen H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *Br Med J* 1995; 311:913–917.
 - Lehuen, A., Lantz, O., Beaudoin, L., Laloux, V., Carnaud, C., Bendelac, A., Bach, J. F., and Monteiro, R. C. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 1998; 188, 1831-9.
 - Lesage S, Hartley SB, Akkaraju S, Wilson J, Townsend M, Goodnow CC. Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2002;196:1 1175 175– 88.
 - Liblau, R. S., Singer, S. M., and McDevitt, H. O. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases [see comments]. *Immunol Today* 1995; 16, 34-8.
 - Liston A, Lesage S, Gray DH, O'Reilly LA, Strasser A, Fahrner AM, et al., Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity* 2004;21:8 817. 17.
 - Lundholm M, Motta V, Lofgren-Burström A, Duarte N, Bergman ML, Mayans S, Holmberg D. Defective induction of CTLA-4 in the NOD mouse is controlled by the NOD allele of Idd3/IL-2 and a novel locus (Ctex) telomeric on chromosome 1. *Diabetes* 2006; 55(2):538-44.
 - Mandrup-Poulsen T. Beta cell death and protection. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 1005:32-42.
 - Martins, T. C., and A. P. Aguas. Mechanisms of Mycobacterium avium-induced resistance against insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in non-obese diabetic (NOD) mice: role of Fas and Th1 cells. *Clin Exp Immunol* 1999; 115:248.
 - Oldstone, M. B., R. Ahmed, and M. Salvato. Viruses as therapeutic agents. II. Viral reassortants map prevention of insulin-dependent

- diabetes mellitus to the small RNA of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Exp Med* 1990; 171:2091.
- Penha-Gonçalves, C., Lejon, K., Persson, L. and Holmberg, D. (1995). Type I diabetes and the control of dexamethazone-induced apoptosis in mice maps to the same region on chromosome 6. *Genomics*. 1995;28:398-404
 - Penha-Goncalves C, Moule C, Smink LJ, Howson J, Gregory S, Rogers J, Lyons PA, Suttie JJ, Lord CJ, Peterson LB, Todd JA, Wicker LS. Identification of a positional and functional candidate gene for type I diabetes by complete sequencing of the Idd10 region. *Diabetes* 2003; 52, 1551-1556.
 - Podolin PL, Wilusz MB, Cubbon RM, Pajvani U, Lord CJ, Todd JA, et al. Differential glycosylation of interleukin 2, the molecular basis for the NOD Idd3 type I diabetes gene? *Cytokine* 2000;12(5):477- 82.
 - Pociot F, McDermott MF: Genetics of type I diabetes mellitus. *Genes Immun* 2002; 3:235-249
 - Pugliese A, Gianani R, Moromisato R, et al.; HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody positive first degree relatives of patients with insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 1995; 44: 608-613.
 - Romball, C. G., and Weigle, W. O. (1984). T cell competence to heterologous and homologous thyroglobulins during the induction of experimental autoimmune thyroiditis. *Eur J Immunol* 14, 887-93.
 - Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashouria Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al., B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 2000; 12: 431 - 40.
 - Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RC, Gough SC, Todd JA: Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type I diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 2004; 53: 3020-3023.
 - Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyanthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bing-Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC: Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423:506 -511.
 - van Parijs, L., Perez, V. L., and Abbas, A. K. (1998). Mechanisms of peripheral T cell tolerance. *Novartis Found Symp* 215, 5-14; discussion 14-20, 33-40.
 - Whiteley, P. J., Poindexter, N. J., Landon, C., and Kapp, J. A. (1990). A peripheral mechanism preserves self-tolerance to a secreted protein in transgenic mice. *J Immunol* 145, 1376-81.

