

Prevalência de Auto-anticorpos e Alterações na Activação de Células T em Diabéticos Tipo IA Portugueses

T. Vassilevskaya, I. Rolim, H. Catarino, L. Gardete Correia¹, J. Manuel Boavida¹, R. Duarte¹, J. Raposo¹, R. Pina¹, M. Beirão Catarino², C. Penha Gonçalves

¹Instituto Gulbenkian de Ciência, Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal

²Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Resumo

A identificação de marcadores moleculares e celulares da progressão da Diabetes Tipo IA poderá representar uma contribuição para a compreensão da patogénese desta doença. Neste estudo, analisamos um grupo de doentes de Diabetes Tipo IA para determinar os títulos de auto-anticorpos típicos desta doença e investigámos a expressão de marcadores moleculares de co-estimulação das células T. Os nossos resultados mostram que a prevalência dos auto-anticorpos anti-GAD, anti-IA-2 e anti-insulina variam com a idade nos doentes de Diabetes Tipo IA e é mais alta nos adultos jovens que em doentes mais velhos. Mais ainda, os nossos resultados preliminares revelam que as alterações de expressão de moléculas co-estimuladoras nas células T de doentes de Diabetes Tipo IA pode ser revelada em ensaios de estimulação *in vitro*. Estes resultados estão em consonância com estudos feitos noutros países que sugerem que apesar da heterogeneidade etiológica da Diabetes Tipo IA existem parâmetros biológicos que podem ser utilizados como marcadores do processo patogénico.

Abstract

A better understanding of Type IA diabetes pathogenesis could arise from identification of molecular and cellular markers of disease progression. In this study, we analyzed a group of Portuguese Type IA diabetes patients to determine titers of autoantibodies and to study the expression of T cell co-stimulatory molecules after *in vitro* activation. Our results show that the prevalence of autoantibodies anti-GAD, anti-IA-2 and anti-insulin varies with age in TIAD patients and is significantly higher in young adults than in older individuals. Additionally, our preliminary data shows that impairments in expression of co-stimulatory molecules in T cells of Type IA diabetes patients may be revealed after *in vitro* stimulation. These results are in agreement with studies performed in other countries suggesting that despite disease heterogeneity common biological correlates may be useful as markers of the pathogenesis process.

INTRODUÇÃO

A incidência da Diabetes Tipo I está a aumentar em diversas populações, afectando, actualmente, 0,4% da população europeia. As razões subjacentes a este aumento de incidência não se conhecem, contudo tem ganhando do peso a hipótese de um aumento da penetrância de alelos de susceptibilidade à diabetes, como resultado de alterações ambientais, poderá estar na sua base. Depois da introdução da terapêutica com insulina nos anos 1930s, o aumento do número de indivíduos geneticamente susceptíveis também tem sido considerado responsável pelo aumento da incidência da doença.

O mecanismo patológico da DT1A assenta na destruição auto-imune das células beta dos ilhéus de Langerhans do pâncreas o que leva a uma dependência completa de insulina exógena.

Como noutras doenças auto-imunes, a etiologia da DT1A tem uma natureza complexa, resultando da acção de múltiplos genes e de factores ambientais. Assim, a identificação de marcadores patogénicos, moleculares e celulares, poderá contribuir para uma melhor compreensão da DT1A. A presença de anticorpos anti-antígenos dos ilhéus pancreáticos é um importante marcador da auto-imunidade associada à diabetes. A sua determinação está generalizada e é utilizada na identificação de indivíduos que apresentam um risco aumentado de desenvolver a doença, e ainda no estudo da história natural do ataque auto-imune. Por outro lado, a análise da função das células T pode ser útil para uma melhor compreensão das bases genéticas da DT1A, nomeadamente na

contribuição do gene *ctla4* como factor de patogenicidade. De facto, os genes relacionados com a activação de células T têm sido frequentemente investigados e vários estudos sugerem o seu envolvimento na auto-reactividade das células T, em diferentes doenças auto-imunes. Este trabalho apresenta resultados de uma investigação que teve por objectivo estudar a prevalência de auto-anticorpos séricos e a activação de células T numa população portuguesa de doentes com DT1A.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Participantes

Os doentes de DT1A seleccionados para participar neste estudo são atendidos pelos serviços clínicos da Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal. Os doentes participantes foram informados dos objectivos do estudo e concederam por escrito o seu consentimento de participação. O estudo foi aprovado pela comissão de ética da Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal. As amostras de controlos saudáveis provêm de dadores anónimos.

2. Material Biológico

Amostras de sangue venoso foram colhidas para tubos de co-lheita CPT.

As células brancas foram isoladas segundo as indicações do fabricante (Becton & Dickinson) foram congeladas e conservadas a -80°C para ensaios de activação. Foi preparado soro que foi conservado -80°C .

3. Titulação de Anticorpos

Foram pesquisados, pelo método ELISA, anticorpos anti-ácido glutâmico descarboxilase (GAD 65, *glutamic acid descarboxilase*), anti-antígenos IA-2 das células dos ilhéus e anti-insulina.

No doseamento dos auto-anticorpos anti-GAD 65 e anti-IA-2, utilizou-se o sistema estreptavidina/IA-2 biotina, uma anti-IgG marcada com peroxidase e ABTS, como substrato (Roche Diagnostics). No doseamento dos auto-anticorpos anti-insulina, o conjugado era igualmente constituído por anti-IgG marcada com peroxidase, tendo como substrato o TMB (Orgentec Diagnostics).

No estudo dos auto-anticorpos séricos foram analisados 76 doentes DT1A, que foram divididos em dois grupos etários, um grupo com menos de 18 anos de idade e outro com doentes entre os 18 e os 40 anos de idade.

4. Activação de Células T "In Vitro"

No estudo das alterações de activação dos linfócitos periféricos foram estudados 71 doentes DT1A, e 21 indivíduos saudáveis, que constituíram o grupo controlo.

A expressão de CTLA4 e CD28 nas células T CD4 analisada por citometria de fluxo, usando anti-corpos monoclonais marcados, após um período de 48 horas de activação, *in vitro*, com anti-CD3 (10µg/ml).

RESULTADOS

Neste estudo, analisámos as concentrações de auto-anticorpos séricos num grupo de doentes DT1A e estudámos a expressão de moléculas co-estimuladoras das células T, após activação *in vitro* comparando um grupo de doentes DT1A com um grupo controlo de indivíduos saudáveis.

1. Auto-anticorpos

A presença e o título de auto-anticorpos são considerados marcadores relevantes no diagnóstico e no curso natural da DT1A. Assim, foram determinadas as concentrações de anticorpos anti-antígenos das células beta em amostras de 76 doentes portugueses com DT1A. Foram pesquisados anticorpos anti-ácido glutâmico descarboxilase (GAD, *glutamic descarboxilase acid*), anti-antígenos IA-2 das células dos ilhéus e anti-insulina, pelo método ELISA. Os doentes foram divididos em dois grupos etários, um grupo com menos de 18 anos e outro com doentes entre os 18 e os 40 anos de idade.

Os resultados mostram que, para os três anticorpos testados, o número de doentes com resultados positivos é superior no grupo de doentes com menos de 18 anos (Figura 1). De facto, a prevalência de cada um dos três auto-anticorpos está diminuída em cerca de 50% no grupo de doentes com mais de 18 anos (Quadro 1). Além disso, o número de indivíduos com resultados positivos para mais de um anticorpo foi significativamente mais baixo no grupo dos doentes com mais de

18 anos (7.5%), quando comparado com o grupo de doentes mais novos (30%). Estes resultados estão de acordo com outros estudos realizados com doentes DT1A, noutras populações caucasianas, e indicam que a auto-reactividade humoral diminui com a progressão da doença, possivelmente devido à eliminação progressiva de auto-antígenos provenientes das células beta.

2. Activação das Células T

Foram pesquisadas alterações na activação nos linfócitos periféricos de 71 doentes DT1A por comparação com 21 controlos saudáveis. Analisámos em particular as moléculas superficiais envolvidas na co-estimulação e regulação negativa de células T, as moléculas CTLA4 e CD28. O gene *ctla4* foi identificado como um gene de susceptibilidade à diabetes, mas o seu papel na doença ainda não foi esclarecido. A molécula CD28 é conhecida por competir com a molécula CTLA4 para a ligação a moléculas co-estimulatórias (nomeadamente CD80 e CD86) que se expressam nas células apresentadoras de antígenos.

A expressão de CTLA4 nas células T CD4, após um período de 48 horas de activação *in vitro* com anti-CD3, foi quantificada por citometria de fluxo. A determinação da intensidade média de fluorescência de CTLA4 na população linfocitária CD4+, após o período de activação, mostrou não existir diferença significativa entre doentes e não doentes, no que se refere à regulação positiva de CTLA4 (Figura 2 A).

Do mesmo modo, estudámos a regulação positiva de CD28, após activação *in vitro* com anti-CD3, quantificando a expressão de CD28 pela intensidade de fluorescência em citometria de fluxo. Em cada indivíduo, a indução de expressão de CD28 foi estimada como a razão dos níveis de expressão de CD28 depois da activação e os níveis de expressão na ausência de activação. Os resultados indicam que a indução da regulação positiva de CD28 nas células T de doentes com DT1A não está alterada quando comparada com controlos saudáveis (Figura 2 B). Contudo, os níveis de expressão de CD28 em células CD4 que não expressam CTLA4, depois de activação com anti-CD3 *in vitro*, são significativamente mais baixos nos doentes que nos controlos saudáveis ($P = 0,006$) (Figura 2 C). Estes resultados indicam que a fracção de células T que expressam baixos níveis de CD28 está aumentada nos doentes com DT1A.

Quadro 1 - Prevalência relativa de auto-anticorpos em dois grupos etários de doentes DT1A.

| | Prevalência de Auto-anticorpos (%) | | |
|----------------------|------------------------------------|----------|---------------|
| | Anti-GAD | ANTI-IA2 | Anti-Insulina |
| Doentes < 18 anos | 0.56 | 0.27 | 0.17 |
| Doentes 18 - 40 anos | 0.34 | 0.14 | 0.09 |
| Todos os doentes | 0.46 | 0.21 | 0.13 |

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que a prevalência de auto-anticorpos anti-GAD, anti IA-2 e anti-insulina varia com a idade do doente DT1A e é significativamente mais elevada em jovens

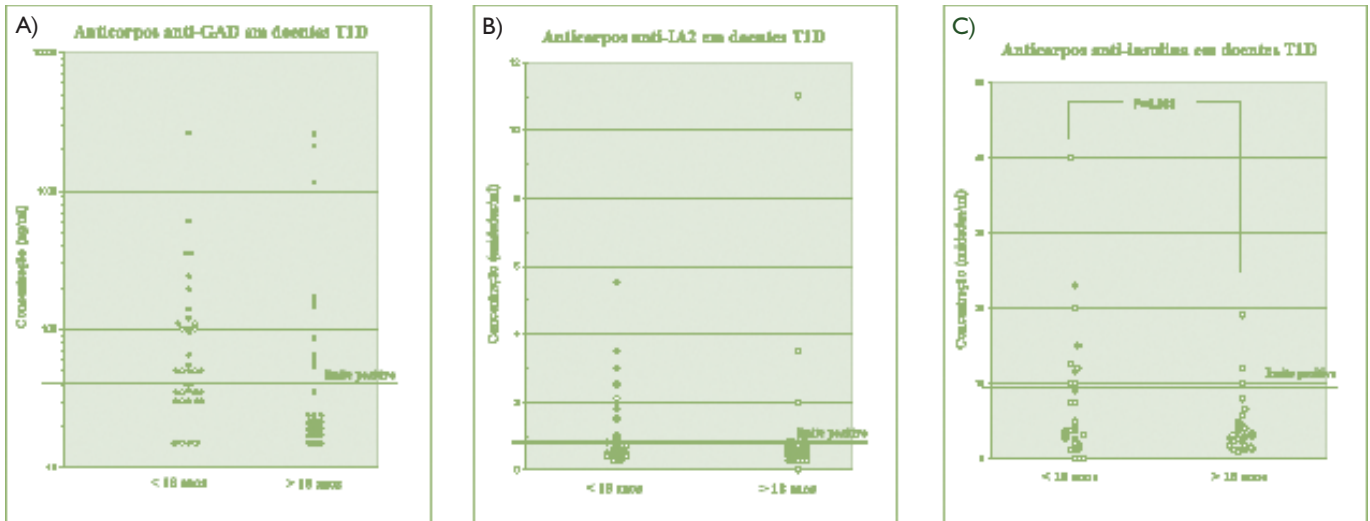


Figura 1 - Concentração sérica de auto-anticorpos em doentes DT1A. As concentrações de anticorpos anti-GAD (A), anti-IA2 (B) e anti-insulina (c) foram determinadas em 76 doentes DT1A. Os doentes foram divididos em dois grupos etários: com menos de 18 anos (< 18) e com mais de 18 e menos de 40 anos (> 18). As diferenças de auto-anticorpos entre grupos etários foram avaliadas estatisticamente por T-teste e o valor p indica a significância estatística das diferenças observadas.

adultos que em indivíduos mais velhos. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados noutros países sugerindo que apesar da heterogeneidade da doença, os auto-anticorpos devem ser considerados como parâmetros biológicos que poderão ser úteis como marcadores patogénicos da evolução e da história natural da doença. Para além disso, os nossos dados mostram que podem ser encontradas alterações na expressão de moléculas co-esti-

muladoras em células T de doentes DT1A, após estimulação *in vitro*. De facto, as células refractárias à expressão de CTLA4 após estimulação têm frequência significativamente maior nos doentes com DT1A e expressam níveis de CD28 menos elevados. É provável que esta população celular inclua o *pool* de células T que contactaram com o antígeno, sendo identificáveis por um fenótipo anergia/memória. Assim, os resultados sugerem que o *pool* células anérgico/memória

Quadro II - Número de auto-antígenos reconhecidos por anticorpos de dois grupos etários de doentes DT1A.

| | Doentes < 18 anos | | Doentes 18 - 40 anos | |
|-------------------|-------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
| | Número de casos | Prevalência (%) | Número de casos | Prevalência (%) |
| 3 Auto-anticorpos | 2 | 5.0 | 0 | 0.0 |
| 2 Auto-anticorpos | 10 | 25.0 | 3 | 7.5 |
| 1 Auto-anticorpos | 15 | 37.5 | 14 | 35.0 |
| 0 Auto-anticorpos | 14 | 35.0 | 18 | 45.0 |

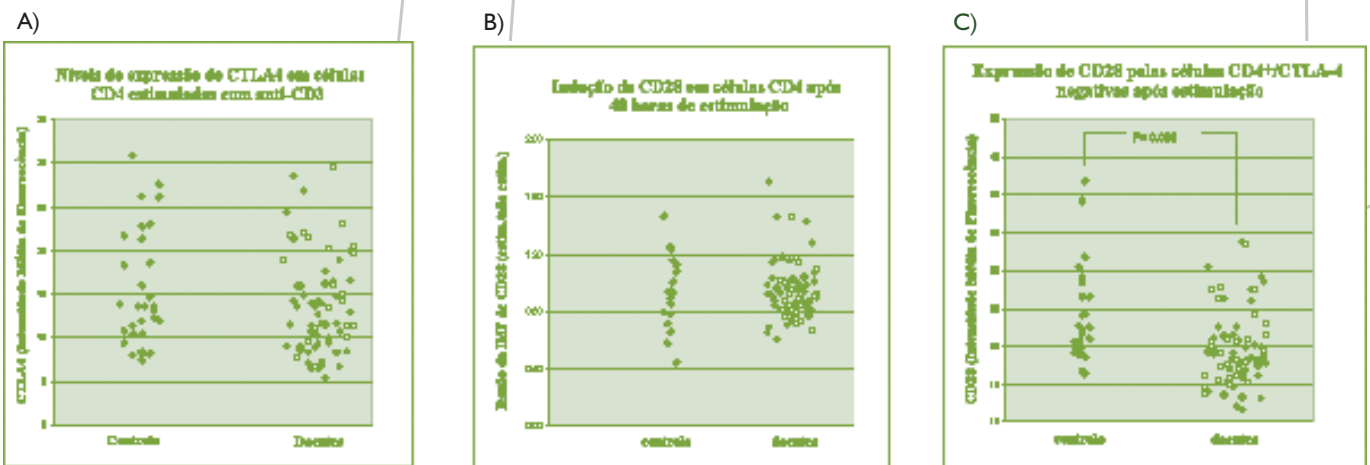


Figura 2- Análise da expressão de moléculas co-estimuladoras das células T em doentes DT1A. A expressão de CTLA4 e a indução da expressão de CD28 foi estudada nas células CD4+ de 71 doentes DT1A e 21 controlos. As diferenças observadas foram avaliadas estatisticamente por T-teste e o valor p indica a significância estatística das diferenças observadas.

estão aumentadas nos doentes com DT1A. Este trabalho irá ser prolongado tendo em vista um aumento do tamanho da amostra, a confirmação da significância estatística dos dados e a procura de associação de variação genética em *loci* de susceptibilidade à diabetes auto-imune. Designadamente, será testado se os alelos de susceptibilidade à DT1A, no locus CTLA4, estão envolvidos no controlo quantitativo de fenótipo de acumulação de células T anérgicas ou de memória.

BIBLIOGRAFIA

- Janne Pitkaniemi, Päivi Onkamo, Jaakko Tuomilehto and Elja Arjas. Increasing incidence of Type 1 diabetes - role for genes? BMC Genetics. 5: 5. Apr 2004.
- Kavvoura F, Ioannidis J. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes *mellitus*: a huge review and meta-analysis. Am J Epidemiol. 1;162(1): 3-16. Jul 2005.
- Hermann R, Laine AP, Veijola R, Vahlberg T, Simell S, Lahde J, Simell O, Knip M, Ilonen J. The effect of HLA class II, insulin and CTLA4 gene regions on the development of humoral beta cell autoimmunity. Diabetologia. 48 (9): 1766-1775. Sep 2005.
- Pearce S, Merriman T. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. Trends In Molecular Medicine. 12 (2): 90-98. Feb 2006.
- Gianani R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes: 2005. Immunol Rev. 204: 232-49. Apr 2005.
- Barker J. Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. J Clin Endocrinol Metab. 91(4): 1210-7. Apr 2006.
- Yoon JW, Jun HS. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. Am J Ther.;12(6): 580-91. Dec 2005.
- Silveira PA, Grey ST. B cells in the spotlight: innocent bystanders or major players in the pathogenesis of type 1 diabetes. Trends Endocrinol Metab. 17 (4): 128-35. May-Jun 2006.
- Catherine Pihoker, Lisa K. Gilliam, Christiane S. Hampe, and Åke Lernmark. Autoantibodies in Diabetes. Diabetes 54: S52-S61. 2005.

