

Asociación de células NKT con la expresión del gen CTS_L en población pediátrica mexicana con diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico

Rita Angélica Gómez-Díaz^{1*}, Roberto Medina-Santillán², Blanca Elena Castro-Magdone³, Carolina Bekker-Méndez⁴, Jaime Gómez-Zamudio⁵, Elisa Nishimura-Meguro⁶, Eulalia Garrido-Magaña⁶, Lorena Lizárraga-Paulin⁷, Blanca E. Aguilar-Herrera⁷, Adán Valladares-Salgado⁵, Miguel Cruz⁶, Rafael Mondragón-González¹, Vianney Ortiz-Navarrete⁸ y Niels H. Wacher¹

¹Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; ²Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional; ³Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; ⁴Unidad de Investigación Médica en Infectología e Inmunología, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS; ⁵Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; ⁶Servicio de Endocrinología, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS; ⁷Servicio de Endocrinología Pediátrica, UMAE Hospital General Dr. Gaudencio González Garza, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS; ⁸Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Ciudad de México, México

Resumen

Objetivo: Comparar el nivel de expresión del gen CTS_L y su correlación con células NKT en pacientes con diabetes tipo 1 (DT1) de reciente inicio, sus hermanos y controles sanos. **Métodos:** Diseño transversal analítico. Se incluyeron pacientes con DT1 de < 3 meses de evolución, sus hermanos y controles sanos. Se midió porcentaje y números absolutos de células NKT y la expresión del gen CTS_L. **Resultados:** Se analizaron 124 sujetos con DT1 (n = 48), hermanos (n = 44) y controles (n = 32). La HbA1c fue mayor y el péptido C menor en DT1 que en los otros dos grupos, y la edad de sus hermanos fue mayor ($p < 0.001$). No se encontró diferencia de células NKT entre DT1 (0.176 ± 0.202) y controles (0.118 ± 0.133), pero el porcentaje fue mayor en hermanos (0.246 ± 0.188 , $p = 0.002$). El nivel de expresión a la baja del gen CTS_L se asoció con el número absoluto ($r = 0.4607$; IC 95%: $-0.08425-0.7935$; $p = 0.043$) y con el porcentaje de células NKT ($r = 0.4540$; IC 95%: $-0.0927-0.7903$; $p = 0.045$) en DT1. **Conclusiones:** Los pacientes con DT1 mostraron un bajo porcentaje y números absolutos de células NKT comparados con sus hermanos. El porcentaje y los números absolutos correlacionaron con niveles bajos de expresión del gen CTS_L en DT1.

PALABRAS CLAVE: Células NKT. Catepsina-L. Diabetes tipo 1. Hermanos. Controles sanos.

Abstract

Objective: To compare the level of expression of the gene CTS_L and its correlation with NKT cells in patients with recent-onset type 1 diabetes (T1D), their siblings, and healthy controls. **Methods:** Analytical cross-sectional design. Patients with T1D < 3 months evolution, their siblings, and healthy controls were included. Percentages and absolute numbers of NKT cells

Correspondencia:

*Rita Angélica Gómez-Díaz
Av. Cuauhtémoc, 330
Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc
C.P. 06725, Ciudad de México, México
E-mail: ritagomezdia@yahoo.com.mx

were measured with expression of the CTSL gene. **Results:** 124 subjects: with T1D ($n = 48$), siblings ($n = 44$) and controls ($n = 32$) were included. HbA1c was greater and C-peptide lower in T1D than the other groups and sibling age was higher ($p < 0.001$). There were no differences in NKT cells between T1D (0.176 ± 0.202) and controls (0.118 ± 0.133), but the percentage was higher in siblings (0.246 ± 0.188 ; $p = 0.002$). Lower level of expression of the CTSL gene associated with both absolute number ($r: 0.4607$; 95% CI: -0.08425 to -0.7935 ; $p = 0.043$) and percentage of NKT cells ($r: 0.4540$; 95% CI: -0.0927 to -0.7903 ; $p = 0.045$) in the T1D group. **Conclusions:** Patients with T1D have lower percentage and absolute number of NKT cells compared to their siblings. NKT cells absolute numbers are correlated with the expression of CTSL in T1D patients. (Gac Med Mex. 2016;152:14-21)

Corresponding author: Rita Angélica Gómez-Díaz, ritagomezdia@yahoo.com.mx

KEY WORDS: Cathepsin-L. Healthy control. NKT cell. Sibling. Type 1 diabetes.

Introducción

La diabetes tipo 1 (DT1) es considerada como una enfermedad autoinmune órgano-específica, en la que participan factores etiológicos de tipo inmunológico, genético y ambiental. Su prevalencia va en incremento en todo el mundo¹ y nuestro país no es la excepción^{2,3}. Se han implicado algunos virus como posibles iniciadores, aceleradores o precipitantes de la enfermedad⁴⁻⁶.

Entre los factores genéticos postulados, dos regiones han sido bien caracterizadas: el complejo principal de histocompatibilidad (HLA) en el cromosoma 6p21 (IDDM1)^{7,8} y la región de la insulina en el cromosoma 11p15.5 (IDDM2)⁹⁻¹². Posterior al escaneo del genoma, varios otros, como el gen de la PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) han sido propuestos, pero los genes específicos del todo responsables aún no se han establecido¹³⁻¹⁵. IDDM12, localizado en el cromosoma 2q33, es uno de los *loci* de susceptibilidad de DT1 confirmado¹⁶. Esta región de 300 kilobases contiene al menos tres genes: *CD28*, *CTLA-4* y la molécula inducible coestimuladora de genes (*ICOS*). El mapeo genético ha sugerido que *CTLA-4* o un gen en estrecha proximidad puede estar implicado en la susceptibilidad para DT1¹⁷.

Por otro lado, la cathepsina-L es una proteasa lisosomal que presenta funciones diversas y específicas¹⁸. Participa en la selección positiva de las células T CD4+ y en la homeostasis de las células T. La proteasa lisosomal cathepsina-L (CTSL) ejerce una amplia influencia sobre el sistema inmune.

Badano, et al.¹⁹ demostraron que el gen *CTSL* regula negativamente la producción de células B y, por lo tanto, influye sobre la homeostasis de las células B periféricas.

Un estudio *in vitro* en células de pacientes con DT1 encontró un aumento en la actividad de la cathepsina-G

y sugiere la noción de que esta cathepsina desempeña un rol crítico en el procesamiento de la proinsulina y es importante en el proceso de activación de las células T en la diabetes²⁰.

Aunque se sabe que la respuesta autoinmune en la DT1 se debe a una falla de los mecanismos reguladores de la inmunidad adquirida, los cuales corresponden a la expansión y/o función de las poblaciones de linfocitos T reguladores²¹, a la fecha no se ha identificado con precisión a la población de células reguladoras; existen varios candidatos, entre los que se incluyen los linfocitos T CD4+ CD25+ y las células tipo linfocitos asesinos naturales, denominados NKT por sus siglas en inglés²².

Las células NKT son reguladoras del sistema inmune; el número disminuido se asocia a la aparición de DT1 en ratones diabéticos no obesos (NOD, por sus siglas en inglés)²³, pero las observaciones en humanos son contradictorias y a la fecha no está claramente establecido el papel de las células NKT en la etiología de la enfermedad, en gran medida por la carencia de marcadores que permitan identificar el estado activado de esas células, así como la expresión de los genes en humanos identificados en células NKT de modelos murídos (*locus Idd9; Idd6, NKp46, NKt1 y NKt2*) en las fases iniciales del proceso autoinmune²⁴.

Los resultados de un estudio previo realizado por nuestro grupo de trabajo demostraron que la baja frecuencia de células NKT es un rasgo familiar que sugiere un estado de activación probablemente determinado por factores genéticos, y esta característica podría ser otro factor de susceptibilidad en lugar de una causa directa de la enfermedad. Lo anterior hizo evidente la necesidad de estudios genéticos prospectivos para establecer la fuerza de asociación y determinar el papel de esta población de linfocitos en el contexto de la fisiopatología, así como un posible mecanismo²⁵.

Por lo anterior, es nuestro interés profundizar en el estudio de la participación de las células NKT mediante la identificación de la población activada *in vivo*, la alteración de la respuesta humorar y su expresión genética al inicio de la enfermedad de pacientes con DT1. Hacen falta estudios sobre la relación de las células NKT con la expresión del gen *CTSL* en modelos animales, y aún más en pacientes portadores de la enfermedad.

Un estudio utilizando ratones *CTSL^{nkt/nkt}* demostró que la falta de actividad de la *CTSL* genera alteraciones tempranas en la selección positiva de los timocitos *CD4+*. Además, regula el nivel de expresión de diversos componentes de la matriz extracelular en los órganos linfoides, y tiene influencia sobre el número y la composición de las poblaciones linfoides T centrales y periféricas²⁶.

Maeahr, et al.²⁷, utilizando como modelo experimental ratones *CTSL^{nkt/nkt}* (portadores de una delección en el gen que codifica para la *CTSL*), demuestran un incremento en el número de células B en los ganglios linfáticos, el bazo y la sangre periférica. La *CTSL* regula negativamente la producción y la exportación de los linfocitos B por la médula ósea y el número de células B periféricas²⁷.

Recientemente, Yossef, et al.²⁸ reportaron que la activación del receptor *NKp46* es esencial para el desarrollo de DT1. Sin embargo, a la fecha no está establecido en humanos el papel de las células NKT y la expresión del gen *CTSL* como biomarcador y/o potencial regulador de las células NKT en la fisiopatología de la DT1.

Un evento esencial en el desarrollo de los linfocitos T de memoria *CD8+* es el escape de los progenitores de la muerte celular programada, pero no está del todo claro cómo se lleva a cabo esta mediación.

Si la expresión del gen que codifica para *CTSL* dependiente del factor de transcripción *NF-κB* está disminuida, hipotetizamos que *CTSL* interviene promoviendo la supervivencia de los linfocitos T citotóxicos, los cuales están implicados en la DT1.

Nuestro objetivo fue comparar el nivel de expresión del gen *CTSL* y su asociación con las células NKT en pacientes con DT1 de reciente inicio, sus hermanos y controles sanos.

Métodos

El estudio fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica del Instituto Mexicano de Seguro Social (IMSS), conforme a la Declaración de Helsinki

actual. Se realizó en las Unidades de Investigación en Epidemiología Clínica y Bioquímica de la UMAE Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional Siglo XXI, el Servicio de Endocrinología de la UMAE Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI, el Servicio de Endocrinología Pediátrica de la UMAE Hospital General Dr. Gaudencio González Garza y la Unidad de Investigación Médica en Infectología e Inmunología del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza, del IMSS, en colaboración con la Escuela Superior de Medicina y el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del CINVESTAV, del Instituto Politécnico Nacional.

Se incluyeron pacientes con DT1 del periodo comprendido de marzo del 2012 a marzo del 2015, de acuerdo con los criterios de la *American Diabetes Association*²⁹, con diagnóstico de DT1 con una duración de la enfermedad menor de 3 meses a partir del diagnóstico, cualquier sexo, mayores de 2 años y menores de 17 años, así como los hermanos de los pacientes con DT1 y sujetos sanos de la misma edad y sexo, sin antecedentes de diabetes ni de enfermedad autoinmunitaria (como hipotiroidismo o hipertiroidismo, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, síndrome nefrótico o síndrome de Cushing). Se excluyeron pacientes con diagnóstico de diabetes tipo 2, MODY, neonatal o secundaria. La población de sujetos sanos que se invitó a participar tenía las mismas características que su contraparte con diabetes, hijos de los trabajadores derechohabientes de las UMAE del CMN SXXI y de la Escuela Benito Juárez de la SEP.

Previo consentimiento informado tanto de los pacientes como de sus hermanos y de los sujetos sanos, se registraron el antecedente familiar de diabetes, el día de inicio de la enfermedad, las medidas antropométricas (edad, peso, talla, índice de masa corporal, tensión arterial), el peso al nacer y el antecedente de lactancia al seno materno. Se tomaron muestras sanguíneas de 10-15 cc con una jeringa estéril para la determinación de *HbA1c*, insulina, péptido C, anticuerpos anti-GAD-AB, anti-IA2-AB, antiinsulina, HLA, células NKT y la expresión del gen *CTSL*. Las células NKT se midieron por citometría de flujo.

Obtención de células mononucleares

Las muestras de sangre heparinizada se diluyeron en una relación 1:1 con solución *buffer* fosfato salino (PBS), y posteriormente se agregaron en tubos de 15 cm³ que contenían Ficoll Hypaque en una relación

1:2 de muestra sanguínea/Ficoll. Se centrifugó 30 minutos a 1,600 rpm a temperatura ambiente. Las células mononucleares fueron recuperadas de la interfase y la fenotipificación de las poblaciones se llevó a cabo mediante citometría de flujo utilizando los anticuerpos anti-CD3, anti-CD8, anti-V α 24 y anti-V β 11.

Análisis mediante citometría de flujo

Previo a la tinción con los anticuerpos específicos, las células mononucleares se incubaron con gammaglobulina humana 30 μ g/1 \times 10 6 células durante 20 minutos a 4 °C, y posteriormente se distribuyó con una cantidad de 2 \times 10 6 células en cada tubo para citometría. Se emplearon los anticuerpos anti-human-CD3, anti-CD8 (BD Biosciences) y anti-V α 24 y anti-V β 11 (Beckman Coulter). Para todos los casos, los anticuerpos se adicionaron e incubaron durante 30 minutos a 4 °C, y luego el exceso de anticuerpo se eliminó lavando con exceso con PBS y centrifugando por 5 minutos a 1,500 rpm a 4 °C. Primero se adicionaron en los tubos correspondientes los anticuerpos purificados, y luego el anticuerpo secundario fue acoplado a Cy5 (300 ng/2 \times 10 6), y por último los anticuerpos específicos para la fenotipificación de las células NKT y CD8. Los números absolutos de la población de células NKT los calculamos utilizando el número de leucocitos y el porcentaje de linfocitos reportados en la biometría hemática tomada el mismo día que se realizó la citometría de flujo. Para el cálculo mencionado utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{Células NKT/ml: } \frac{\text{Leucocitos} \times \% \text{ linfocitos (en la BH)}}{100} \times \frac{\% \text{ células NKT (en la citometría de flujo)}}{100} \times 1,000$$

De igual manera, para la obtención del porcentaje de linfocitos CD8+ seleccionamos la región correspondiente de acuerdo a su tamaño y granularidad en la citometría de flujo. Para los números absolutos de CD8+ tomamos en cuenta el número de leucocitos y el porcentaje de linfocitos reportados de la biometría hemática.

La obtención del RNA total se realizó de la siguiente manera: la sangre total se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 minutos y se extrajeron las células blancas (*buffy coat*) para la extracción del RNA total. A 200 μ l de *buffy coat* se le adicionó 1 ml de TRIPURE (ROCHE) y se homogenizó por agitación. Se adicionaron 200 μ l de cloroformo y se homogenizó la muestra, y posteriormente se centrifugó a 11,200 rpm a 4 °C durante 15 minutos. Se tomaron 500 μ l de la fase acuosa, se

adicieron 500 μ l de isopropanol y se centrifugó a 11,200 rpm a 4 °C por 15 minutos para precipitar el RNA. Una vez formado el botón de RNA, se lavó con etanol al 75% en agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) y se centrifugó a 10,200 rpm y a 4 °C durante 10 minutos. Se evaporó el etanol y el RNA total se resuspendió en agua tratada con DEPC. La concentración de RNA se obtuvo por espectrofotometría (Epoch) a 260 nm, mientras que la calidad (1.8-2.0) se obtuvo de la relación de absorbancia 260/280. La integridad del RNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes teñido con bromuro de etidio.

Se tomaron 2.5 μ g de RNA total para la reacción de transcriptasa reversa utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el cDNA, se cargó junto con la Taqman OpenArray Real Time system en placas OpenArray con el formato de 56 genes (Applied Biosystem, Foster City, CA), con la ayuda del sistema Accufill (Applied Biosystem, Foster City, CA). Las placas OpenArray contenían las sondas Taqman para el gen *CTSL* y los genes de referencia *HPRT*, *18S* y *TLR4*. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real de 40 ciclos con el OpenArray Real Time PCR Instrument (Applied Biosystem, Foster City, CA); las condiciones de amplificación fueron las establecidas por el fabricante de acuerdo a los genes contenidos en el arreglo. El análisis de los resultados de amplificación de las muestras se realizó con el programa OpenArray Real Time qPCR Analysis software (Applied Biosystem, Foster City, CA).

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para conocer la distribución de los datos, y las de ANOVA o Kruskal-Wallis para comparar el promedio de células NKT entre los tres grupos. Se compararon los grupos por pares mediante la prueba t de Student para muestras independientes y la de χ^2 para comparar el porcentaje y los números absolutos de las células NKT entre dos grupos. Para el análisis de expresión del gen *CTSL* se creó un archivo .GCT para las muestras (columnas) que pasaron el filtro de calidad: el valor máximo de error del 20% (valor de expresión 10). Las muestras que no pasaron el filtro de calidad se descartaron del análisis. Se utilizó el módulo *Comparative Marker Selection* para calcular la significancia entre las clases y compararlas.

Tabla 1. Características antropométricas de los sujetos estudiados

Variable	Pacientes con DT1	Controles sanos	Hermanos de pacientes con DT1	p
n	48	32	44	
Edad (años)	9.30 ± 3.85 (2-16)	9.56 ± 4.72 (2-16)	13.61 ± 6.78 (3-27)	< 0.001†
Sexo (M)	23 (47.9%)	14 (43.8%)	19 (43.2%)	0.365‡
Peso (sz)	0.106 ± 1.04 (-3- 2.25)	0.11 ± 1.05 (-1.88-2.21)	0.36 ± 0.84 (-1.61-1.88)	0.343*
Talla (sz)	-0.0030 ± 1.09 (-2.44-3.93)	0.38 ± 1.5 (-2.17-3.70)	0.032 ± 1.31 (-3.23-4.18)	0.332*
IMC (sz)	0.208 ± 1.10 (-3-1.64)	-0.93 ± 1.27 (-3-2)	0.31 ± 1 (-2.97-1.81)	0.311*
TAS (sz)	-1.36 ± 0.63 (-2.65-0.60)	-1.32 ± 1 (-4.18-1.64)	-1.23 ± 0.66 (-3.06-0.08)	0.741*
TAD (sz)	-0.16 ± 0.63(-1.19-1.19)	-0.011 ± 0.77 (-1.44-1.64)	0.10 ± 0.500 (-0.91-1.27)	0.204*

*ANOVA.

†Kruskal Wallis

‡ χ^2

M: Masculino; sz: valor z de las tablas de la CDC; TAS: Tensión arterial sistólica; TAD: Tensión arterial diastólica.

Se determinó el coeficiente de correlación Rho de Spearman entre las células NKT y la expresión del gen *CTSL*, con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Se consideraron significativos los valores de $p < 0.05$. Se utilizó el paquete SPSS para Windows versión 16.0 y GraphPath Prism 6.01 2012 para realizar los gráficos.

Resultados

Se incluyeron pacientes con DT1 ($n = 48$) con 44.9 ± 26.0 (0-95) días de evolución desde el inicio de la enfermedad, 32 controles sanos y 44 hermanos de pacientes con DT1. Las características clínicas de los tres grupos se describen en la Tabla 1. La distribución por sexo fue igual entre los grupos (hombres: 43.9% controles, 47.9% pacientes con DT1 y 43.2% hermanos de pacientes; $p = 0.365$). Las características antropométricas entre los grupos no mostraron diferencia significativa. El 6.3% (3/48) de los pacientes tienen antecedente heredofamiliar de DT1. Con respecto al peso al nacer, no hubo diferencias entre los pacientes [3162 ± 478 g (2200-4070)] y el grupo control [3241 ± 457 g (2350-4050)] ($p = 0.572$), y tampoco para el antecedente de la lactancia al seno materno [9.13 ± 7.89 (0-36) vs. 8.58 (0-24) ($p = 0.811$), respectivamente].

En la Tabla 2 se describen las variables bioquímicas y la positividad para autoanticuerpos. La hemoglobina glucosilada A1c fue mayor en los pacientes (7.65%) que en el grupo control y en los hermanos de los pacientes (5.35 y 5.20%; $p < 0.001$). Como era de esperar, el péptido C fue menor en los pacientes (0.89 ng/ml)

que en los controles (2.01 ng/ml) y en los hermanos (1.64 ng/ml) ($p < 0.001$).

La presencia de anticuerpos anti-GAD65 fue más frecuente en los pacientes que en el grupo control y en los hermanos de los pacientes (60.8 vs. 6.3 vs. 2.3%, $p < 0.001$, respectivamente, $p < 0.001$). El anti-IA2 también fue más frecuente en los pacientes (61.3%) que en los controles (3.1%) y los hermanos (11.4%) ($p < 0.001$). La medición de anticuerpos frente a insulina solo se realizó en aquellos pacientes que al momento de la toma aún no habían recibido manejo con insulina, y aunque fue más frecuente en el grupo de los casos, no se observó diferencia estadística entre los grupos (47.7, 6.2 y 34.1% en pacientes, controles y hermanos, respectivamente; $p = 0.631$).

En relación a la frecuencia de HLA de protección, fue mayor en los hermanos que en los pacientes, aunque no hubo diferencia estadísticamente significativa (Tabla 2).

La positividad de anticuerpos correlacionó con el HLA de riesgo, mostrando una correlación débil (anti-GAD65: $r = 0.272$, $p = 0.016$; anti-IA2: $r = 0.427$, $p < 0.001$; antiinsulina: $r = 0.429$, $p = 0.031$).

Los datos relacionados con el porcentaje y los números absolutos de las células NKT en cada grupo se muestran en la Tabla 2. Dado que el porcentaje de células NKT y el número absoluto de células NKT (cel/ml) no poseen una distribución normal, y tratando de buscar alguna diferencia de estas variables entre los grupos, aplicamos la prueba de Kruskal-Wallis y encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.002$). El porcentaje de células NKT fue diferente

Tabla 2. Características clínicas, bioquímicas y genéticas de los sujetos estudiados

Variable	Pacientes con DT1	Controles sanos	Hermanos de pacientes con DT1	p
n	48	32	44	
HbA1c (%)	7.65 ± 1.95 (4.1-13.3)	5.35 ± 0.3898 (4.5-6.1)	5.20 ± 0.88 (3.8-9.2)	< 0.001*
Insulina (ng/ml)	22.78 ± 21 (5-112.6)	16.24 ± 20.43 (2-107)	13.3 ± 5.97 (5-29)	0.045*
Péptido C (ng/ml)	0.89 ± 0.781 (0-3)	2.01 ± 9.23 (0-50)	1.64 ± 0.793 (0-4)	< 0.001*
GAD65 (casos +)	28/46 (60.8%)	2/31 (6.3%)	1/43 (2.3%)	< 0.001†
IA2 (casos +)	27/44 (61.3%)	1/31 (3.1%)	5/38 (11.4%)	0.005†
Antiinsulina (casos +)	21/44 (47.7%)	1/32 (6.2%)	15/29 (34.1%)	0.631†
Dos o más anticuerpos	18/47 (38.2%)	0/32 (0%)	2/44 (4.5%)	< 0.001†
HLA II protector	9/46 (19.6)	4/31 (12.9)	14/44 (31.8)	0.130†
HLA II de riesgo	38/46 (82.6)	26/31 (83.9)	37/44 (84.1)	0.980†
Porcentaje células NKT	0.176 ± 0.202 (0.029-0.917)	0.118 ± 0.133 (0.018-0.616)	0.246 ± 0.188 (0.010-0.830)	0.002*
Números absolutos células NKT	401.790 ± 443.069 (21-1,930)	337.120 ± 298.663 (43-1,152)	633.79 ± 481.617 (10-2,111)	0.005*

+: positivos.

*Kruskal Wallis.

† χ^2 .

DT1: diabetes tipo 1; HbA1c: hemoglobina glucosilada; HLA: antígeno leucocitario humano; NKT: células T natural killer.

entre los grupos, siendo menor en los pacientes que en los hermanos (0.118 vs. 0.246%) y los controles sanos (0.118 vs. 0.176%) ($p = 0.002$), tal como se observa en la Tabla 2.

Cuando se comparó la expresión del gen *CTSL* hubo diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes ($p = 0.002$) (Fig. 1). Al realizar el análisis de correlación, con aquellos pacientes que mostraron el menor porcentaje de células NKT, observamos que presentaron una correlación significativa ($r = 0.4540$, intervalo de confianza del 95% [IC 95%]: -0.0927-0.7903; $p = 0.045$) con aquellos que presentaron menor expresión del gen *CTSL* (Fig. 2 A), al igual que con los números absolutos de células NKT ($r = 0.4607$; IC 95%: -0.08425-0.7935; $p = 0.043$) (Fig. 2 B).

Discusión

La población de linfocitos T conocida como células NKT tiene un papel importante en la regulación de la respuesta inmune. La interacción del sistema inmune innato y el adaptativo se ha vuelto un foco importante en la investigación de las enfermedades autoinmunes.

Aunque las observaciones en relación a la menor cantidad y la función alterada de las células NKT han explicado parte del fenómeno inicial que desencadena la diabetes, son escasos los estudios en humanos y los resultados hasta ahora son controversiales.

La selección de pacientes en estadios tempranos de la enfermedad, desde el punto de vista de la historia natural de la enfermedad, es uno de los momentos más parecidos, inmunológicamente, al momento del inicio de la cascada inmunológica, aunque los cambios inmunogenéticos se gestan en etapas aún más tempranas. Sin embargo, al momento en que se diagnostica a los pacientes con DT1, aún queda tejido pancreático susceptible de ser atacado, y por otro lado, la población mayormente susceptible al desarrollo de la enfermedad son los hermanos de estos pacientes, por lo que la observación del comportamiento inmunológico de éstos es trascendente.

En este trabajo analizamos la población de células NKT utilizando los anticuerpos anti-CD3, anti-V α 24 y anti-V β 11 como marcadores que caracterizan a estas células, y analizamos por microarreglo la expresión del gen que codifica para *CTSL*. Encontramos que la

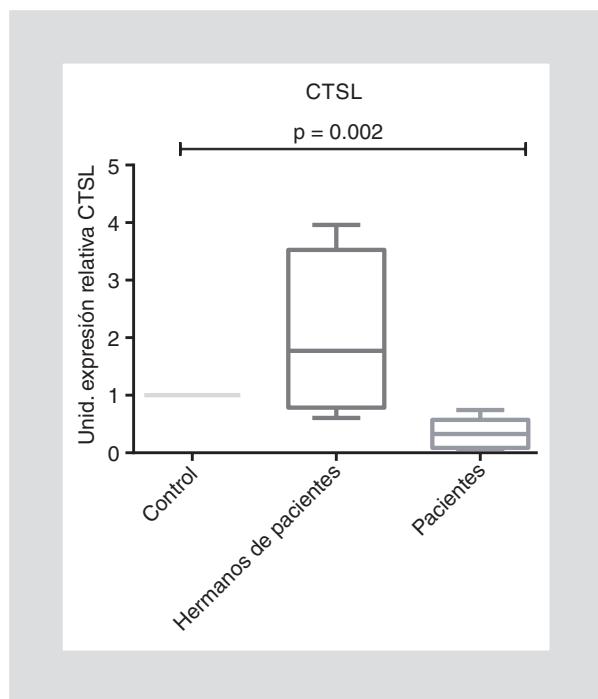


Figura 1. Comparación de la expresión del gen *CTSL* entre el grupo control, los hermanos de los pacientes y los pacientes. Se observan diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes ($p = 0.002$, *U* de Mann-Whitney, mediana con rango intercuartil).

cantidad de células NKT fue diferente entre los grupos, siendo mayor en el grupo de los hermanos con DT1 que en el resto de los grupos. En nuestro estudio no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el número de células NKT entre los pacientes y los controles sanos, contrario a lo reportado por Kukreja, et al.³⁰ (en DT1 $0.38\% \pm 0.02\%$ y en sanos $0.74 \pm 0.06\%$).

Las cifras reportadas por este grupo no han podido reproducirse por otros estudios, y hasta ahora es el que ha observado un comportamiento numérico similar entre el humano y el ratón NOD. Los resultados que se observaron se asemejan a los del Lee, et al.³¹, que encuentran una gran variabilidad de concentración de células NKT, habiendo desde lecturas mínimas hasta muy elevadas en todos los grupos, y llamando la atención que la cantidad de estas células fuese mayor en el grupo de los hermanos. Oikawa, et al.³², en una cohorte de sujetos japoneses, encuentran una mayor cantidad de células NKT en aquellos con DT1, independientemente del tiempo de evolución, comparados con controles sanos ($0.127 \pm 0.015\%$ en DT1 vs. $0.065 \pm 0.009\%$ en sujetos sanos).

Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio que se realiza en población pediátrica correlacionando los datos del análisis de expresión del gen *CTSL* con el porcentaje y los números absolutos de las células NKT en población pediátrica con DT1. Recientemente, Jin et. al.³³ identificaron cinco genes que en combinación pueden servir como biomarcadores para estratificar el riesgo de progresión a DT1, los cuales fueron validados usando la cohorte del estudio DAISY (*Diabetes Autoimmunity Study in the Young*) en los sujetos con positividad para autoanticuerpos.

De acuerdo con los resultados del presente estudio, las diferencias en la expresión a la baja del gen *CTSL* correlacionó con el menor porcentaje de células NKT de estos pacientes en comparación con sus hermanos.

Con estos hallazgos, es necesario hacer seguimiento periódico a largo plazo a los hermanos de los pacientes

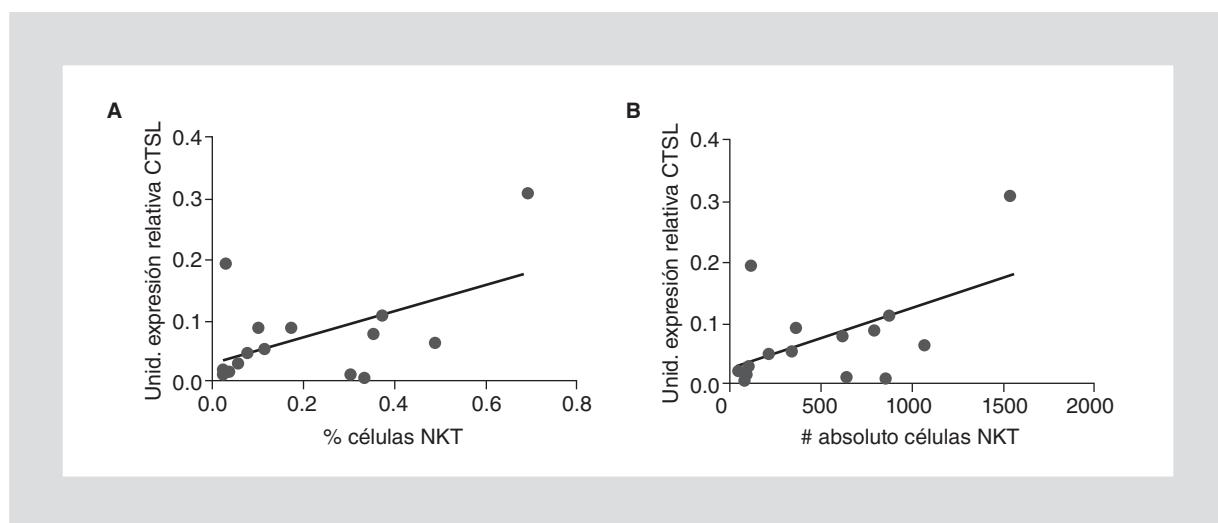


Figura 2. Correlación Rho de Spearman de la expresión del gen *CTSL*. **A:** Porcentaje de células NKT ($r = 0.4540$; IC 95%: $-0.0927-0.7903$; $p = 0.0452$); **B:** Número de células NKT ($r = 0.4607$; IC 95%: $-0.08425-0.7935$; $p = 0.043$) en pacientes con DT1.

con DT1 que presentan HLA de riesgo, positividad para los anticuerpos y pérdida de la primera fase de secreción de insulina, para predecir el riesgo de progresión a diabetes con el porcentaje de células NKT y el patrón de expresión del gen *CTSL* y evaluar su utilidad como marcadores predictivos de riesgo para el desarrollo de la enfermedad.

Conclusión

Los pacientes con DT1 mostraron un bajo porcentaje y números absolutos de células NKT comparados con sus hermanos. El porcentaje y los números absolutos correlacionaron con niveles bajos de expresión del gen *CTSL* en pacientes con DT1.

Reconocimientos

El estudio fue financiado por el FIS y CONACYT (FIS/IMSS/PROT/640 CONACYT.SALUD, proyecto 87852).

Conflicto de intereses

No existe conflicto de interés por parte de los autores.

Bibliografía

- Patterson C, Guariguata L, Dahlquist G, Soltész G, Ogle G, Silink M. Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103:161-75.
- Gómez-Díaz RA, Garibay-Nieto N, Wacher-Rodarte N, Aguilar-Salinas CA. Epidemiology of type 1 diabetes in Latin America. *Current Diabetes Reviews*. 2014;10:75-85.
- Gómez-Díaz RA, Pérez-Pérez G, Hernández-Cuesta IT, et al. Incidence of type 1 diabetes in Mexico: data from institutional register 2000-2010. *Diabetes Care*. 2012;35(11):e77.
- Von Herrath MG, Holz A, Homann D, Oldston MB. Role of viruses in type 1 diabetes. *Semin Immunol*. 1998;10:87-100.
- van der Werf N, Kroese FG, Rozing J, Hillebrands JL. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2007;23:169-83.
- McIntosh EDG, Menser M. A fifty-year follow-up of congenital rubella. *Lancet*. 1992;340:414-5.
- Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ gene contributes to susceptibility and resistance to IDDM. *Nature*. 1987;329:599-604.
- Undlien DE, Lie BA, Thorsby E. HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends Genet*. 2001;17:93-100.
- Thomson G, Robinson W, Kuhner M, Joe S, Kiltz W. HLA and insulin gene associations with IDDM. *Genet Epidemiol*. 1989;6:155-60.
- Bennett ST, Lucassen AM, Gough SCL, et al. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet*. 1995;9:284-92.
- Bell GI, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 1984;33:176-83.
- Todd JA, Farrall M. Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes. *Hum Mol Genet*. 1995;5:1443-8.
- Pugliese A, Miceli D. The insulin gene in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002;18:13-25.
- Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*. 1994;371:130-6.
- 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.
- Marron MP, Zeidler A, Raffel LJ, et al. Genetic and physical mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM12) to a 100-kb phagomid artificial chromosome clone containing D2S72-CTLA4-D2S105 on chromosome 2q33. *Diabetes*. 2000;49:492-9.
- Ueda H, Howson JMM, Esposito L, et al. Association of the T cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003;423:506-11.
- Benavides F, Starost MF, Flores M, et al. Impaired hair follicle morphogenesis and cycling with abnormal epidermal differentiation in nackt mice, a cathepsin L-deficient mutation. *Am J Pathol*. 2002;161:693-703.
- Badano MN, Camicia GL, Lombardi G, et al. B-cell lymphopoiesis is regulated by cathepsin L. *PLoS ONE*. 2013;8:e61347.
- Zou F, Schäfer N, Palesch D, et al. Regulation of cathepsin G reduces the activation of proinsulin-reactive T cells from type 1 diabetes patients. *PLoS ONE*. 2011;6:e22815.
- Lehuen A, Diana J, Zaccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:501-13.
- Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:131-42.
- Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, et al. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14-Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med*. 1998;188:1831-9.
- Gur C, Porgador A, Elboim M, et al. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol*. 2010;11:121-8.
- Beristain-Covarrubias N, Canche-Pool E, Gómez-Díaz R, Sánchez-Torres LE, Ortiz-Navarrete V. Reduced INKT cells numbers in type 1 diabetes patients and their first-degree relatives. *Immun Inflamm Dis*. 2015;3:411-9.
- Lombardi G, Burzyn D, Mundiniano J, et al. Cathepsin-L influences the expression of extracellular matrix in lymphoid organs and plays a role in the regulation of thymic output and of peripheral T cell number. *J Immunol*. 2005;174:7022-32.
- Maehr R, Mintern JD, Herman AE, et al. Cathepsin L is essential for onset of autoimmune diabetes in NODE mice. *JCI*. 2005;115:2934-43.
- Yossef R, Gur C, Shemesh A, et al. Targeting natural killer cell reactivity by employing antibody to NKp46: implications for type 1 diabetes. *PLoS One*. 2015;10:e0118936.
- ADA Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20:1183-97.
- Kukreja A, Cost G, Marker J, et al. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest*. 2002;109:131-40.
- Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest*. 2002;110:793-800.
- Oikawa Y, Shimada A, Yamada S, et al. High frequency of valpha24(+) vbeta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25:1818-23.
- Jin Y, Sharma A, Bai S, et al. Risk of type 1 diabetes progression in islet autoantibody-positive children can be further stratified using expression patterns of multiple genes implicated in peripheral blood lymphocyte activation and function. *Diabetes*. 2014;63:2506-15.