

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Manuella Maria Silva Santos

**Avaliação do papel dos polimorfismos nos genes *HLA-G* e *IL4R* na
suscetibilidade ao Diabetes mellitus tipo 1**

Recife

2014

Manuella Maria Silva Santos

**Avaliação do papel dos polimorfismos nos genes *HLA-G* e *IL4R* na
suscetibilidade ao Diabetes mellitus tipo 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Sergio Crovella

Coorientador: Rafael Lima Guimarães

Recife

2014

Catálogo na Fonte:

Elaine Cristina Barroso

CRB 1728

Santos, Manuella Maria Silva

Avaliação do papel dos polimorfismos nos genes *HLA-G* e *IL4R* na susceptibilidade ao Diabetes mellitus tipo 1/ Manuella Maria Silva Santos. . Recife: O Autor, 2014.

76 f.: il., fig., tab.

Orientador: Sérgio Crovella

Coorientador: Rafael Lima Guimarães

Dissertação (mestrado) . Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2014.

Inclui bibliografia e apêndice

1. Polimorfismos (genética) 2. Diabetes 3. Doenças autoimunes I. Crovella, Marcelo (orientador) II. Guimarães, Rafael Lima (coorientador) III. Título

576.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-204

Manuella Maria Silva Santos

**Avaliação do papel dos polimorfismos nos genes *HLA-G* e *IL4R* na
suscetibilidade ao Diabetes mellitus tipo 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em 14/03/2014

Banca Examinadora:

Prof.^o Dr. Rafael Lima Guimarães/UFPE-Genética

Dr^a.JaquelineAzevêdo Silva/UFPE-LIKA

Prof^aDr^a. Mônica Lúcia Adam/UFPE- CAV

Prof^o Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra/UFPE-Genética

Recife

2014

Dedico aos meus pais.

Agradecimentos

À Deus, minha fortaleza.

À minha amada mãe, por se fazer presente em cada etapa da minha vida, orientando e confiando nas minhas escolhas, amparando nos momentos difíceis e sempre me fazendo acreditar que sou capaz de fazer muito mais.

Ao meu amado pai, por todos os momentos gratificantes e pelo discernimento nos bons conselhos dados para minha vida.

Ao meu irmão, pelo amor, carinho e admiração.

Ao meu namorado Marcel, que apesar de tão pouco tempo de convivência tem feito a diferença em minha vida e foi fundamental na finalização desta dissertação me proporcionando apoio e segurança.

À Juarez (in memoriam), amizade, carinho, respeito e amor dedicado, saudade eterna.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sergio Crovella, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa, amizade e confiança.

À Rafael Lima Guimarães, pela atenção sempre dada e toda ajuda disponibilizada.

À Lucas Brandão (Luquinhas), pela confiança, amizade e ensinamento.

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto, por toda atenção e incentivo.

À Nathália de Alencar, por toda paciência e ensinamentos transmitidos e contribuição à realização deste trabalho.

À Jaqueline Azevedo, pelo apoio, amizade e muitos momentos de aprendizado.

À prof Paula Sandrin, por toda ajuda diária no laboratório.

À minha amiga Lídia, que mesmo distante se faz presente em todas as etapas da minha vida.

Aos meus queridos amigos Gabriela, Arthur, José, Vanessa, Thiago e Daniel pela amizade verdadeira e apoio de sempre.

Aos colegas do LIKA, Anselmo, Antônio, Catarina, Ronald, Zilma, Natassia, Eduardo pela amizade e muitos momentos de descontração.

%Caminhando sempre rumo ao horizonte, o mundo é
muito grande para se ficar parado.%

(Juarez Ramos)

RESUMO

Aproximadamente 40% do risco genético para o Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é atribuído à região HLA classe II, contudo, outras regiões são associadas aos processos autoimunes ligados à doença. No presente estudo foi avaliada a associação entre variações genéticas do Antígeno Leucocitário Humano G (*HLA-G*), região HLA classe I não-clássica, e o receptor de interleucina4 (*IL4R*), região não-HLA, em pacientes DM1 do estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. O trabalho foi do tipo caso-controle e os pacientes foram estratificados de acordo com a presença da doença celíaca (DC) e tireoidite autoimune (AITD). O polimorfismo indel de 14 pb do *HLA-G* foi genotipado por reação em cadeia da polimerase (PCR) com subsequente visualização por eletroforese em gel de agarose 3% e, os polimorfismos de base única (SNPs) (rs1805010, rs1805011, rs1805013, rs1805015, rs1805016 e rs1801275) do *IL4R* foram genotipados por PCR em tempo real. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas no indel 14 pb, entre as frequências dos pacientes (5%) e controles saudáveis (12%) do genótipo para inserção (I / I) ($p = 0,028$, OR = 0,39). Os SNPs genotipados no gene *IL4R* não obtiveram resultados de associação estatisticamente significantes. Este é o primeiro trabalho que realiza um estudo de associação do indel 14 pb do *HLA-G* em DM1 como também, o primeiro no Brasil associando polimorfismos do *IL4R* com a doença.

Palavras-chave: Antígeno Leucocitário Humano-G; Diabetes mellitus tipo 1; doenças autoimunes; receptor de interleucina-4.

ABSTRACT

Approximately 40% of the genetic risk for type 1 diabetes mellitus (T1DM) is attributed to the HLA class II region, but other regions are investigated as related to autoimmune processes linked to disease. In the present study we evaluated the association between genetic variants of the Human Leukocyte Antigen G (*HLA -G*), HLA class I nonclassical region and interleukin 4 receptor (*IL4R*), non-HLA region in T1DM in Pernambuco, Northeast of Brazil. The study was case-control and patients were stratified according to the presence of celiac disease (CD) and autoimmune thyroiditis (AITD). The indel polymorphism 14 bp in *HLA-G* was genotyped by polymerase chain reaction (PCR) with subsequent visualization by electrophoresis in agarose gel at 3 % and the SNPs in *IL4R* (rs1805010, rs1805011, rs1805013, rs1805015, rs1805016 and rs1801275) were genotyped by real-time PCR. Statistically significant differences were found in the 14 bp indel between the frequencies of the patients (5 %) and healthy controls (12 %) of insertion genotype (I / I) ($p = 0.028$, OR = 0.39). The *IL4R* gene, did not obtain statistically significant differences between the frequencies. This is the first work that realizes an association study of the 14 bp indel of *HLA-G* and DM1 and also the first in Brazil to assess the possible association between *IL4R* polymorphisms with this disease.

Keywords: human leucocyte antigen-G; Type 1 Diabetes Mellitus; autoimmune diseases; interleukin 4 receptor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	A incidência de diabetes tipo 1 em crianças de 0-14 anos, por região geográfica e ao longo do tempo.	21
Figura 2.	Infiltração dos linfócitos T nas células provocando a insulite.	26
Figura 3.	Gráfico demonstrando a contribuição do <i>Locus</i> MHC à predisposição do Diabetes mellitus tipo 1, em comparação com outros de menor contribuição.	27
Figura 4.	Gráfico com estudos de mapeamento de Loci não-HLA como fatores de risco ao Diabetes tipo 1.	28
Figura 5.	Modelo para a patogênese do DM1 com base genética.	30
Figura 6.	Representação esquemática da localização de genes da região do HLA no cromossomo 6.	31
Figura 7.	Processamento alternativo e isoformas do HLA-G.	34
Figura 8.	Atividades imunorregulatórias mediadas por sHLA-G envolvendo as células e receptores indicados.	35
Figura 9.	<i>Splicing</i> alternativo removendo 92 pb do mRNA do gene HLA-G. (A) Transcrito completo com os 92 pb inseridos na sequência. (B) transcrito com a deleção dos 92 pb.	37
Figura 10.	Ilustração esquemática do complexo do IL4R.	38
Figura 11.	Imagem de eletroforese em gel de agarose, especificando as bandas genotipadas.	45
Figura 12.	Mapa do desequilíbrio de ligação dos seis polimorfismos do IL4R estudados. O mapa foi feito através do software Haploview 4.2. Os valores D' (%) são mostrados nos quadros ($D'=100\%$ para as caixas vazias)	54
Figura 13	Esquema demonstrando a atuação do HLA-G inibindo a diferenciação das células Th.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Loci associados ao Diabetes mellitus tipo 1 por estudos de associação genômica e suas respectivas Oddsratio.	20
Tabela 2.	Critérios para diagnóstico do Diabetes tipo 1 de acordo com os níveis glicêmicos.	23
Tabela 3.	Sequências dos <i>primers</i> para o indel 14 pb.	44
Tabela 4.	Frequências alélicas e genotípicas dos controles e pacientes DM1 estratificados de acordo com a insurgência de Tireoidite autoimune (AITD) e Doença celíaca (DC).	46
Tabela 5.	<i>p</i> -value obtido por meio do teste exato de Fisher comparando as frequências alélicas e genotípicas do HLA-G 14bp inserção / inserção entre os grupos.	48
Tabela 6.	P-value obtido com a correlação da idade do diagnóstico dos pacientes DM1.	49
Tabela 7.	Frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos do gene <i>IL4R</i> dos pacientes DM1 e controles.	51
Tabela 8.	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos do gene <i>IL4R</i> de pacientes DM1 estratificados de acordo com a insurgência de tireoidite autoimune (AITD) e doença celíaca (DC).	52
Tabela 9.	<i>p</i> -value obtido por meio do teste exato de Fisher comparando as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos do <i>IL4R</i> entre grupos estratificados e os controles.	53
Tabela 10.	Frequências haplotípicas de polimorfismos do gene <i>IL4R</i> em comparação entre os grupos de estudos.	55

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADA	Associação Americana de Diabetes	(American Diabetes Association)
APC	Célulaapresentadora de antigen	(Antigen-presenting cell)
CD4+	Células T CD4 positivas	(CD4-positive T cell)
CD8+	Células T CD8 positivas	(CD8-positive T cell)
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócito T citotóxico	(4 protein associated with cytotoxic T lymphocyte)
dL	Decilitro	(Deciliter)
DM	Diabetes mellitus	(Diabetes mellitus)
DM1	Diabetes mellitus tipo 1	(Type1 Diabetes mellitus)
DM2	Diabetes mellitus tipo2	(Type2 Diabetes mellitus)
FPG	Glicemia em jejum	(Fasting glucose)
GAD	Anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico	(Antibodyantidescarboxilaseglutamicacid)
HLA	AntígenoLeucocitárioHumano	(Human Leukocyte Antigen)
IA2	Antitirosinafosfatase	(Antitirosinephosphatase)
IAA	Anticorpos anti-insulina	(Insulinantibodies)
ICA	Anticorposantiilhotapancreática	(Antiisletpancreaticantibodies)
IFN	Interferon	(interferon)
Ig	Imunoglobulina	(immunoglobulin)
IL	Interleucina	(interleukin)
ILR	Receptor de interleucina	(Interleukin receptor)
Kb	Kilobase	(Kilobase)
MG	Miligrama	(milligram)
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal	(Major histocompatibilitycomplex)
Mmol	Milimolar	(millimolar)
mRNA	RNA mensageiro	(RNA Messenger)
NK	<i>Natural Killer</i>	(Natural Killer)

OGTT	Teste de tolerância à glicose	(glucose tolerancetest)
PPI	Pré-pro-insulina	(Pre-pro-insulin)
PTPN22	Proteína tirosino-fosfatase não receptor tipo 22 (linfóide)	(Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (lymphoid))
sHLA-G	Antígeno leucocitário Humano solúvel	(Humanleukocyteantigensoluble)
SNP	Polimorfismo de Base Única	(Polymorphism, Single Base)
Th1	Células T helper tipo 1	(T-helpercellstype1)
Th2	Células T helper tipo 2	(T helpercelltype2)
TNF	Fator de Necrose Tumoral	(Tumor NecrosisFactor)
Treg	Linfócito T regulatório	(Regulatory T lymphocyte)
UTR	Região não traduzida	(Untranslatedregion)
	Beta	(Beta)
	Gama	(Gama)

Sumário

1 Introdução	15
2 Revisão da literatura	16
2.1 Diabetes Mellitus	16
2.2 Diabetes Mellitus Tipo 1	17
2.2.1 Etiologia do Diabetes Mellitus tipo 1	18
2.2.2 Epidemiologia	20
2.2.3 Diagnóstico e Tratamento	22
2.2.4 Sistema Imune e Diabetes Mellitus tipo 1	24
2.2.5 Genética e Patogênese	26
2.3 O Antígeno leucocitário Humano e Diabetes Mellitus Tipo 1	30
2.4 DM1 e os genes do estudo	32
2.4.1 HLA-G	32
2.4.2 IL4R	38
2.5 Polimorfismos genéticos	39
3. Objetivos	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 Material e Métodos	42
4.1 Grupo de estudo	42
4.2 Extração de DNA genômico	42
4.3 Diagnóstico de Tireoidite autoimune e Doença celíaca	42
4.4 Estratificação dos pacientes	43
4.5 Genotipagem dos indivíduos e construção dos haplótipos	43
4.5.1 Seleção dos polimorfismos	43
4.5.2 Gene HLA-G	44

4.5.3 Gene IL4R	45
4.6 Métodos Estatísticos	45
5 Resultados	46
5.1 Indel 14 pb do gene HLA-G	46
5.2 SNPs do gene IL4R	49
6 Discussão	56
6.1 Polimorfismo indel 14 pb HLA-G	56
6.2 Polimorfismos do gene IL4R	58
6.3 HLA-G e IL4R na genética e patogênese do DM1	59
7 Conclusão	61
Referências Bibliográficas	62
Anexo	71

1 Introdução

O Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) acomete mundialmente cerca de 36,6 milhões de indivíduos e tornou-se um problema de saúde pública, devido a uma série de complicações envolvidas na doença.

É caracterizado por ser uma desordem crônica, autoimune, órgão-específica e multifatorial, na qual ocorre a infiltração de linfócitos T nas ilhotas pancreáticas desencadeando a falta ou a deficiência de insulina. Por ser multifatorial envolve a interação de fatores imunológicos e genéticos, pelos quais genes que participam da resposta imune são candidatos que podem desempenhar um papel importante na patogênese da doença, como também de fatores ambientais, incluindo infecção por vírus e determinados componentes da dieta.

O desenvolvimento da autoimunidade se inicia pela perda da autotolerância, que ocorre quando os linfócitos T autorreativos reconhecem antígenos próprios nos tecidos periféricos e, infiltram-se desencadeando processos inflamatórios. No caso do DM1, o órgão afetado é o pâncreas, no qual são destruídas as células produtoras de insulina.

O mecanismo patogênico do DM1 ainda não está completamente esclarecido e, por isso, ao longo de quatro décadas, um grande número de estudos de associação tentam elucidar, quais polimorfismos de genes, envolvidos no processo, participam da regulação de linfócitos T. Neste contexto, os genes Antígeno Leucocitário Humano G (*HLA-G*) e Receptor de interleucina 4 (*IL4R*), diante de observações, foram selecionados nesse estudo, pela função imunorregulatória nas células Te pelo envolvimento na diferenciação desses linfócitos, respectivamente.

Nesse sentido, o presente trabalho visou avaliar o papel dos seguintes polimorfismos: indel 14 pb do *HLA-G* e SNPs (rs1805010, rs1805011, rs18015013, rs1805015, rs1805016 e rs1801275) do gene *IL4R*, em pacientes DM1 e indivíduos saudáveis de uma população do Nordeste brasileiro, a fim de identificar possíveis marcadores genéticos associados à suscetibilidade ao Diabetes mellitus tipo 1.

2 Revisão da Literatura

Os tópicos a seguir se referem a revisão de literatura.

2.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes mellitus (DM) é uma condição clínica caracterizada por um aumento da glicose no sangue, resultante de uma falta total ou relativa na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). As anormalidades metabólicas envolvem carboidratos, proteínas e metabolismo da gordura, afeta todos os grupos etários, embora, comumente, ocorra em adultos (AL-MASKARI *et al.*, 2011).

O DM está classificado em duas categorias etiopatogênicas de acordo com características distintas, em Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e Diabetes mellitus tipo 2 (DM2). O DM1, caracterizado pela destruição autoimune das células beta do pâncreas, é a categoria menos prevalente, acometendo cerca de 5% a 10% dos indivíduos com diabetes, chamados de insulino-dependentes. O DM2 é a categoria mais prevalente, acometendo cerca de 90% a 95% dos casos, chamados de não insulino-dependentes, e abrange os indivíduos que tem, inicialmente, uma relativa resistência à insulina e, na grande maioria dos casos, ao longo da vida não necessita do tratamento com esse hormônio (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). (ABIRU; KAWASAKI; EGUCHI, 2002)

O DM2 é o resultado da resistência à insulina nas células musculares ou adiposas que não respondem, de forma adequada, aos níveis normais de insulina produzidas pelas células beta e está associado com obesidade ou idade avançada (VAN BELLE *et al.*, 2011; COPPIETERS *et al.*, 2012).

A categoria do DM1 resulta do processo de destruição autoimune das células beta produtoras de insulina, que estão presentes nas ilhotas pancreáticas (DOMÍNGUEZ-BENDALA *et al.*, 2012). Esse distúrbio é mais comum em indivíduos com idade abaixo de 30 anos, mas pode acometer indivíduos de qualquer faixa etária (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

DM1 e DM2 tem como característica em comum a hiperglicemia que pode causar complicações de saúde graves, incluindo cetoacidose, insuficiência renal, doenças cardíacas, acidente vascular cerebral e cegueira. Existem alguns casos,

raros, mas atualmente crescentes, nos quais ambos, DM1 e DM2, são diagnosticados em pacientes (VAN BELLE *et al.*, 2011).

2.2 Diabetes Mellitus Tipo 1

O Diabetes mellitus tipo 1 é uma desordem autoimune, órgão específica, desencadeada pela destruição das células pancreáticas, através da infiltração de linfócitos T autorreativos, durante um período assintomático que se estende ao longo de vários anos (YOON ; JUN, 2005; PUGLIESE, 2013).

O desenvolvimento do DM1 ocorre, comumente, entre crianças e adolescentes, sendo uma das doenças crônicas que mais afetam crianças. Contudo, pode acometer indivíduos em qualquer faixa etária, porém, o diagnóstico frequentemente acontece na primeira infância (DIAMOND Project Group, 2006).

Na evolução crônica desse distúrbio são observadas importantes alterações metabólicas nos carboidratos, lipídios e proteínas, com também alterações estruturais como microangiopatia (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macroangiopatia (doença coronariana e insuficiência arterial periférica) (BALDA, 1999).

Em alguns casos, o ataque autoimune não é limitado às células beta e expande-se para outros órgãos, sendo assim, portadores DM1 são propensos a desenvolverem outras doenças autoimunes órgão-específicas endócrinas e autoimunes não endócrinas. A coexistência de manifestações clínicas autoimunes subjacentes à insuficiência de, pelo menos, duas glândulas endócrinas é definida como Síndrome Poliglandular Autoimune (SPA)(VAN DENDRIESSCHE *et al.*, 2009 ; FOURATI *et al.*, 2012).

Por definição, pacientes com Diabetes mellitus tipo 1 e doenças autoimunes adicionais, com exceção da Doença de Addison, preenchem o critério para a síndrome poliglandular III (SPA III)(FOURATI *et al.*, 2012 ; HORIE *et al.*, 2011). Um em cada três pacientes DM1 desenvolve a SPA III e tem pico de incidência entre as idades de 20 a 60 anos; desses indivíduos, cerca de 4-9% irão cursar com Doença Celíaca, 5 a 10% prevê o surgimento de Anemia Perniciosa, 2-10% manifestam Vitiligo e, quando apresentam anorexia nervosa, 0,5% podem cursar com Doença de Addison, nesse caso específico, sendo classificado como APSII.

Além disso, cerca de 25% das meninas e 10% dos meninos evidenciam autoanticorpos na tireoide, desses, metade desenvolvem alguma doença autoimune tireoidiana, em que quatro de cinco casos desenvolvem Tireoidite de Hashimoto, enquanto uma em cinco desenvolverá Doença de Graves (WINTER *et al.*, 2002; EISENBARTH, 2004; QUEIROZ, 2008; VAN DEN DRIESSCHE *et al.*, 2009).

Segundo a Associação Americana de Diabetes (ADA), o Diabetes mellitus tipo 1 é subclassificado em Tipo 1A (autoimune) e Tipo 1B (idiopática). O caráter autoimune no Tipo 1A é distinto do tipo 1B, devido à presença de autoanticorpos nas ilhotas pancreáticas, sendo o tipo existente na grande maioria dos casos. O Tipo 1B designa os que apresentam uma diminuição nos níveis de insulina, são propensos a cetoacidose, exigem a reposição de insulina e não há evidências de autoimunidade. Essa classificação foi possível devido ao crescente número de estudos relacionados à etiologia da doença (ABIRU *et al.*, 2002; WINTER 2002; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

2.2.1 Etiologia do Diabetes mellitus tipo 1

A etiologia do DM1 é multifatorial, envolvendo fatores imunológicos, genéticos e ambientais, que estão relacionados e atuam no desenvolvimento da patologia (FILIPPI ; VON HERRATH, 2008).

Como o DM1 é resultante de um processo autoimune, há uma relevância com relação ao fator imunológico. O mecanismo que desencadeia o ataque aos antígenos próprios é mediado por células linfocitárias, macrófagos e células natural killer, que destroem as células pancreáticas, gerando um processo inflamatório, sendo assim, esse processo é dependente da imunidade celular (BALDA, 1999).

Estudos direcionados à contribuição dos fatores ambientais iniciaram a partir do momento que foram observadas diferenças entre a iniciação e detecção de evidências clínicas do DM1 (KNIP *et al.*, 2005). A busca pelas causas ambientais foi constatada quando demonstrada uma concordância de apenas 30% para o desenvolvimento do DM1 entre gêmeos monozigóticos (KYVIK *et al.*, 1995). Componentes como agentes virais e bacterianos, produtos alimentares, fatores antropométricos, neuronais e hormonais podem ser manifestados antes do processo autoimune e contribuem de forma diferente (REGNÉLL; LERNMARK, 2013).

Os principais agentes virais responsáveis pelas manifestações anteriores ao processo de autoimunidade são os enterovírus e os rotavírus. Aparentemente, promovem a citólise direta das células na inflamação (FILIPPI; VON HERRATH, 2008; COPPIETERS *et al.*, 2012). Já as infecções bacterianas envolvem as bactérias que compõem o intestino. Alguns estudos já mencionaram que a administração de antibióticos e probióticos alteram o equilíbrio da microbiota intestinal em direção a um estado não tolerogênico, dependendo das condições no momento da administração (VAARALA; ATKINSON, 2008 ; VAN BELLE *et al.*, 2011).

Algumas substâncias também podem perturbar respostas fisiológicas locais do sistema imune em diferentes condições, considerados como fatores ambientais casuais (Van Belle *et al.*, 2011). A introdução precoce de leite da vaca, em particular o seu componente albumina, no período gestacional, neonatal e na infância é considerado como fator predisponente da autoimunidade das ilhotas (VAARALA, 2002). Em 1992, Karjalainen e cols. (KARJALAINEN *et al.*, 1992) realizaram um estudo com crianças insulino-dependentes e inferiu que anticorpos para peptídeos de albumina podem participar no desenvolvimento da disfunção das ilhotas pancreáticas. Alguns anos depois, outro estudo acompanhou a dieta de crianças com irmãos afetados, nas quais, alguns, durante o estudo evoluíram ao DM1. Nesse trabalho, a hipótese relacionada foi que o alto consumo de leite de vaca, durante a infância, pode ser diabetogênico em irmãos de crianças com a doença (VIRTANEN *et al.*, 2000). Similar, mas não proporcionalmente, a ingestão precoce de proteínas do trigo, mais especificamente o glúten, pode influenciar o início da autoimunidade, nesse caso seria relacionado a crianças sensíveis ao glúten. E, por fim, outro componente importante de destacar são as propriedades protetoras das vitaminas A e D em portadores de DM1, que inibem a diferenciação de células dendríticas e ativação imune (LITTORIN *et al.*, 2006).

Em relação às contribuições genéticas, os avanços tecnológicos com os estudos de associação humana permitiram identificar mais de 50 genes relacionados ao desenvolvimento do DM1, evidenciando um fator fortemente hereditário (KIM ; LEE, 2009; POCIOT *et al.*, 2010). Na tabela 1, estão dispostos os loci, até o momento, investigados e associados ao Diabetes mellitus tipo 1, através de estudos de associação genômica.

Tabela 1. Loci associados ao Diabetes mellitus tipo 1 por estudos de associação genômica e suas respectivas Odds ratio.

Gene / Região	CRM	SNP	Odds Ratio	Gene / Região	CRM	SNP	Odds Ratio
PTPN22	1	rs2476601	2,05	12q13.2	12	rs1701704	1,31
PGM1	1	rs2269241	1,1	12p13.31	12	rs4763879	1,14
RGS1	1	rs2816316	0,89	SH2B3	12	rs3184504	1,28
IL10	1	rs3024505	0,84	GPR183	13	rs9585056	1,09
IL18RAP	2	rs917997	0,83	14q24.1	14	rs1465788	0,86
AFF3	2	rs9653442	1,09	14q32.2	14	rs4900384	1,09
IFIH1	2	rs1990760	0,86	DLK1	14	rs941576	0,91
STAT4	2	rs7574865	1,06	RASGRP1	15	rs17574546	1,09
CTLA4	2	rs3087243	0,88	15q25.1	15	rs3825932	0,86
CCR5	3	rs11711054	0,85	16p13.13	16	rs2903692	0,81
4p15.2	4	rs10517086	1,09	UMOD	16	rs12444268	1,1
IL2	4	rs4505848	1,13	IL27	16	rs4788084	0,86
IL7R	5	rs6897932	0,89	16q23.1	16	rs7202877	1,28
HLA	6	rs9268645	6,8	DNAH2	17	rs16956936	0,92
BACH2	6	rs3757247	1,13	ORMDL3	17	rs229040	0,87
6q22.32	6	rs9388489	1,17	17q21.2	17	rs7221109	0,95
TNFAIP3	6	rs10499194	0,9	PTPN2	18	rs478582	1,28
TAGAP	6	rs1738074	0,92	CD226	18	rs763361	1,16
SKAP2	7	rs7804356	0,88	19q13.32	19	rs425105	0,86
7p12.1	7	rs4948088	0,77	20p13	20	rs2281808	0,9
GLIS3	9	rs10758593	0,88	UBASH3A	21	rs9976767	1,13
IL2RA	10	rs12251307	1,61	22q12.2	22	rs5753037	1,1
PRKCCQ	10	rs11258747	0,84	IL2RB	22	rs229541	1,12
10q23.31	10	rs10509540	0,75	C1QTNF6	22	rs229541	1,12
INS	11	rs3741208	2,38	GAB3	X	rs2664170	1,16
CD69	12	rs4763879	1,09				

CRM: cromossomo FONTE: A autora

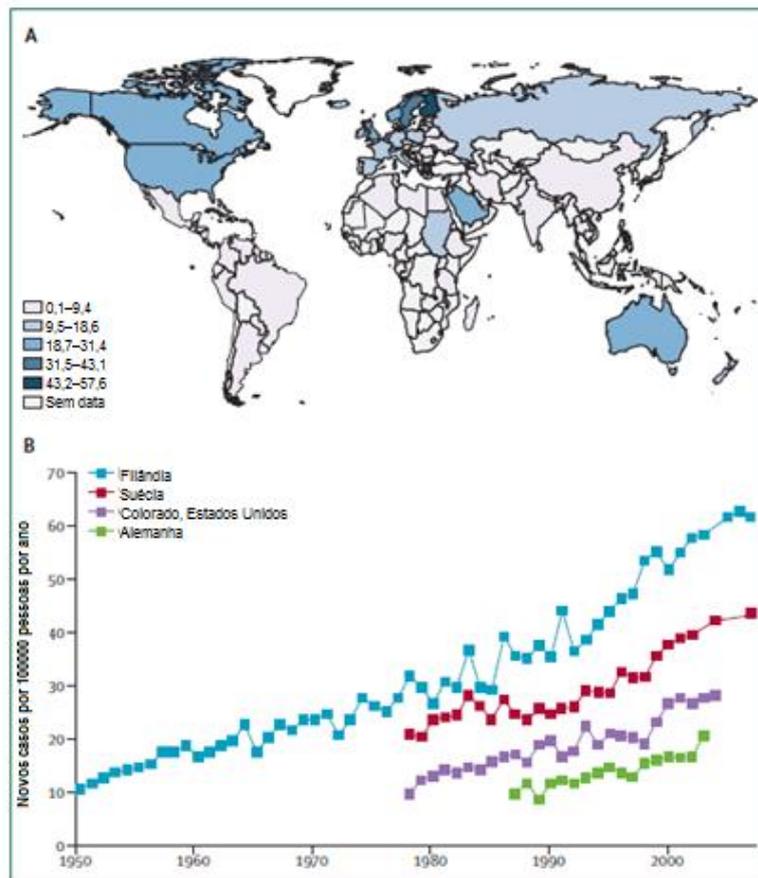
2.2.2 Epidemiologia

O diabetes tipo 1 representa 5 a 10%, acometendo de 10 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). Estima-se que desde 1970, ocorre um aumento anual da doença em torno de 2,5 a 3%(SAVAGE *et al.*, 2010). Mundialmente, a incidência do DM1 é caracterizada por variações devido a mudanças sazonais. Um número maior de casos são diagnosticados no outono e no inverno e entre os nascidos na primavera, apontando

os fatores ambientais como agentes iniciadores da patologia (KAHN *et al.*, 2009; MOLTCHANOVA *et al.*, 2009).

Com poucas exceções, a base populacional do DM1 mostra registros com aumento da incidência de DM1 sobre o tempo. O Projeto DIAMOND, iniciado pela Organização Mundial da Saúde, em 1990, descreve a incidência e tendências de DM1 em crianças com idades entre 0-14 anos, num período de 1990-1999 em 57 países (Figura 1).

Figura 1. A incidência de diabetes tipo 1 em crianças de 0-14 anos, por região geográfica e ao longo do tempo.



FONTE: adaptado de Atkisonet al, 2013

As maiores incidências encontram-se na Finlândia e na Sardenha, onde a taxa é de 60 e 40 casos por 100.000 pessoas a cada ano, respectivamente (HARJUTSALO *et al.*, 2013; PATTERSON *et al.*, 2009). Por outro lado, a doença é incomum em países como a China, Índia e Venezuela, com cerca 0,1 casos por 100.000 pessoas por ano (BORCHERS *et al.*, 2010).

As tendências da incidência agrupadas por continente mostrou aumentos estatisticamente significativos em todo o mundo (4,0% na Ásia, 3,2 % na Europa e 5,3 % na América do Norte), exceto na América Central e na Índia onde a tendência

obteve um decréscimo de 3,6% (DIAMOND *Project Group*, 2006). Foram reportados na Alemanha e Noruega aumentos da incidência anual em 2,6% e 3,3 %, respectivamente. Embora, a Suécia, recentemente, tenha sua taxa de incidência no platô (THUNANDER *et al.*, 2008; EHEHALT *et al.*, 2012).

Em relação ao Brasil, informações sobre a incidência do DM1 são escassas e, em geral, direcionadas a uma cidade ou região específica. Entre 1986 e 2006, a incidência na cidade de Bauru, no estado de São Paulo, foi de 10,4 casos por 100.000 habitantes (NEGRATO *et al.*, 2010). Em Londrina (Paraná), foi reportada uma incidência de 12,7 por 100.00 habitantes (CAMPOS, 1998), enquanto que em Passo Fundo (Rio Grande do Sul) foi de 12 por 100.000 habitantes (LISBÔA *et al.*, 1998).

A taxa de incidência do DM1 varia também por faixa etária e, em geral, aumenta a partir do nascimento, com picos durante a puberdade. No entanto, um declínio é observado após a puberdade e aparentemente é estabilizada na idade adulta jovem, com idade entre 25 a 29 anos (Diamond *Project Group*, 2006).

2.2.3 Diagnóstico e Tratamento

Por muitas décadas os critérios para o diagnóstico do DM1 têm sido baseados pelos níveis de glicose no sangue periférico, pela glicemia em jejum (FPG) ou teste de tolerância à glicose (OGTT). Em 1997 foi criada a Associação Americana de Diabetes, que revisou os critérios de diagnósticos, observando a associação entre a FPG e a retinopatia como fator importante para identificar os níveis limitantes da glicose. De acordo com dados de três estudos, observou que baixos níveis glicêmicos eram proporcionais à poucas retinopatias, enquanto que a prevalências das retinopatias aumentaram com níveis glicêmicos altos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). Na tabela 2 estão dispostos os critérios estabelecidos pela ADA com relação aos níveis glicêmicos de um indivíduo diagnosticado com DM1.

Tabela 2. Critérios para diagnóstico do Diabetes tipo 1 de acordo com os níveis glicêmicos

FPG (glicemiaemjejum)	- 126 mg/dl (7,0 mmol/l) Jejum é definido como por pelo menos 8h de nenhuma ingestão calórica
OGTT (Teste de tolerância à glicose)	- 200 mg/dl (11,1 mmol/l) (75g ou 1,75 g/Kg de peso em crianças)

FONTE: A autora

Além dos testes laboratoriais que analisam os níveis glicêmicos, o diagnóstico clínico é também fundamental. Sintomas como poliúria (volume da urina aumentado), polidipsia (sensação de sede excessiva), perda de peso e, às vezes, polifagia (fome excessiva) e visão turva, podem ser indícios de um possível portador do DM1 (VAN BELLE *et al.*, 2011; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

Existem também exames mais específicos como a avaliação da presença de autoanticorpos nas ilhotas pancreáticas, que nos casos positivos estão presentes em elevado número. Os autoanticorpos mais comuns detectados em indivíduos diagnósticos com o DM1 são: anticorpos anti-ilhota pancreática (ICA), anticorpos anti-insulina (IAA), antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e antitirosinafosfatase (IA2) (MALLONE *et al.*, 2011).

Com o aumento da necessidade de estabelecer biomarcadores associados ao início da doença e sua progressão, o *screening* tem sido utilizado para essa finalidade. A observação da autoespecificidade das células T aos anticorpos revela quantidade, características funcionais e reatividade dessas células. Através do teste sorológico, esses anticorpos podem ser rastreados, possibilitando identificar a quantidade de células T autorreativas, bem como parâmetros de citocinas pró-inflamatórias e imunorreguladoras. O *screening* desses anticorpos é importante por aparecerem antes das características clínicas, permitindo a detecção precoce e a prevenção de morbidades relacionadas a doença. Uma outra estratégia para a triagem de possíveis portadores da doença, é a identificação de alelos de risco, como o caso do DR4-HLA (ARIF *et al.*, 2004; VAN DEN DRIESSCHE *et al.*, 2009).

Apesar dos avanços nos estudos relacionados ao tratamento do DM1, ainda não existe cura, nem tratamentos terapêuticos ou que sejam direcionados à prevenção eficaz, capazes de evitar ou minimizar o processo gradual acumulativo da autoimunidade nos pacientes.

Comumente, o tratamento mais utilizado são as injeções de insulina, mas estudos apontam um possível tratamento através de pílulas com doses baixas de insulina (SKYLER et al., 2005), assim, com o recebimento de um anticorpo monoclonal anti-CD3 que age mantendo a função das células beta, e o paciente fica por mais de ano sem alterações (KEYMEULEN et al., 2010; KEYMEULEN et al., 2005).

Outra opção é o transplante do pâncreas que apesar de, nos últimos anos, ser uma abordagem terapêutica bem sucedida (BURKE et al., 2004; Egidi, 2005), como todo transplante de órgãos, a imunossupressão é ao longo da vida, e os doadores são escassos (GILLESPIE, 2006), dificultando, assim, a realização desse tipo de procedimento. Uma forma alternativa é a injeção combinada de ilhotas de mais de um doador de pâncreas e drogas imunossupressoras, o sucesso desse procedimento vai depender da qualidade e do número de ilhotas. Assim como o transplante do pâncreas, esse procedimento é atualmente limitado pela disponibilidade de doadores de ilhotas (RYAN et al., 2005).

2.2.4 Sistema Imune e Diabetes mellitus tipo 1

O sistema imunológico é um conjunto de vários mecanismos de defesa que estão interligados e tem a capacidade de estabelecer proteção contra as infecções. A defesa é mediada pelas reações iniciais da imunidade natural e respostas tardias da imunidade adquirida (ROITT; DELVES, 2004; ABBAS, et al., 2008).

A imunidade inata e a imunidade adquirida são componentes de um sistema integrado, em defesa do hospedeiro, no qual muitas células e moléculas funcionam em cooperação. A imunidade adaptativa facilita os mecanismos protetores da imunidade inata, como a ativação do sistema complemento através de anticorpos e, além disso, acrescenta um elevado grau de especialização e memória imunológica, tornando-se cada vez mais capacitado no combate a patógenos (BALDA, 1999).

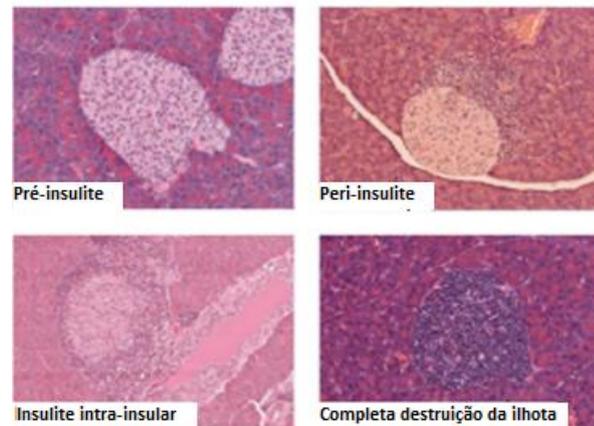
Em determinadas condições, o sistema imune pode sofrer falhas comprometendo o sistema de proteção, que pode ser alterado pelo aumento na proliferação ou deficiência de alguns componentes. Essa desregulação pode direcionar o sistema imune a responder contra o próprio organismo, ou seja, afetar o mecanismo de tolerância, contribuindo para o surgimento da autoimunidade. Esse mecanismo é uma propriedade fundamental do sistema imunológico normal, pois

atua na destruição ou inativação de linfócitos que reconhecem antígenos próprios (JEKER *et al.*, 2012).

A tolerância é um fenômeno imunologicamente específico, pelo qual a exposição de antígenos estranhos aos linfócitos em desenvolvimento induz tolerância a estes antígenos. A autotolerância pode ser induzida em linfócitos autorreativos imaturos, nos órgãos linfóides primários (tolerância central) ou em linfócitos maduros em locais periféricos (tolerância periférica). Quando ocorre a tolerância periférica, as células T maduras reconhecem antígenos próprios dos tecidos periféricos e tornam-se incapazes de responder, subsequentemente, a esses antígenos. A tolerância periférica é devida a anergia, deleção ou supressão através dos linfócitos T regulatórios (Treg), ocorrendo quando as células T CD4⁺ são expostas a um antígeno na ausência de co-estimulação ou imunidade natural tornando-as incapazes de responder à este antígeno (JEKER *et al.*, 2012).

No DM1, a falha na tolerância é mediada por células linfocitárias, macrófagos e células *natural killer*, que irão infiltrar-se nas ilhotas pancreáticas, destruindo as células produtoras de insulina, provocando um processo inflamatório denominado de insulite (figura 2). Na inflamação, a célula linfocitária predominante é o linfócito T CD8⁺ (citotóxicos), mas outras também estão presentes, como linfócitos T CD4⁺ (helper) (Kim ; Lee, 2009). Além da infiltração desses linfócitos autorreativos, a ativação dos linfócitos T CD4⁺ produzem diversas citocinas que irão promover a proliferação e diferenciação de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. As citocinas Th1 secretadas tem como principais constituintes a interleucina 2, o fator de necrose tumoral (TNF- α) e o interferon (γ) que irão interagir com as células apresentadoras de antígenos (APCs), que nesse contexto serão as células β , culminando na apoptose das células β (SILVA *et al.*, 2008).

Figura 2. Infiltração dos linfócitos T nas células provocando a insulite.



FONTE: Adaptada de Bluestone, 2010.

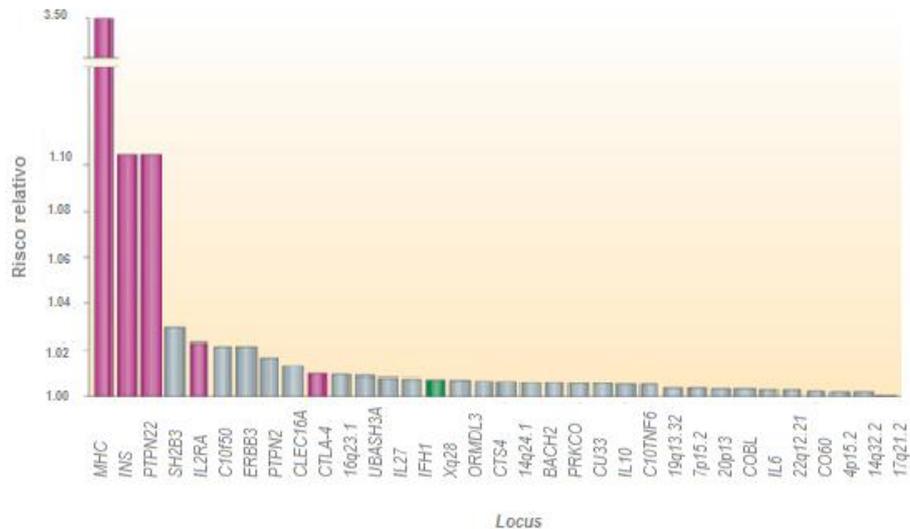
Estudos suportam a ideia que as moléculas que participam coletivamente dos erros nos mecanismos de tolerância, que resultam na patogênese do DM1, têm influência genética. Em especial, as moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA) que apresenta evidenciada predisposição genética (NOBLE ; VALDES, 2011; NOBLE ; ERLICH, 2012; ATKINSON *et al.*, 2013).

2.2.5 Genética e Patogênese

O diabetes mellitus tipo 1 é uma desordem multifatorial e poligênica, na qual sua suscetibilidade é uma característica hereditária (LEMPAINEN ; ILONEN, 2012). A primeira associação genética reportada foi em 1973, por Singal e Blajchman, com a região do Complexo principal de histocompatibilidade (nos humanos, HLA). Nas últimas quatro décadas, os pesquisadores buscam, não apenas, associar quais alelos que codificam genes HLA, mas também outros loci susceptíveis ao DM1 (GAN *et al.*, 2012; NOBLE; ERLICH, 2012; ATKINSON *et al.*, 2013).

Estudos de associação genômica identificaram numerosas regiões gênicas que conferem suscetibilidade ao DM1, mas, com exceção da região do HLA, a contribuição de um único locus é relativamente pequena (Figura 3). Apesar disso, a descoberta desses outros loci não é meramente informativa, já que a soma desses alelos podem fornecer um cálculo global de risco, bem como melhores resultados nas predições de inúmeras doenças (EIKE *et al.*, 2009; TODD, 2010).

Figura 3. Gráfico demonstrando a contribuição do *Locus* MHC à predisposição do Diabetes mellitus tipo 1, em comparação com outros de menor contribuição.



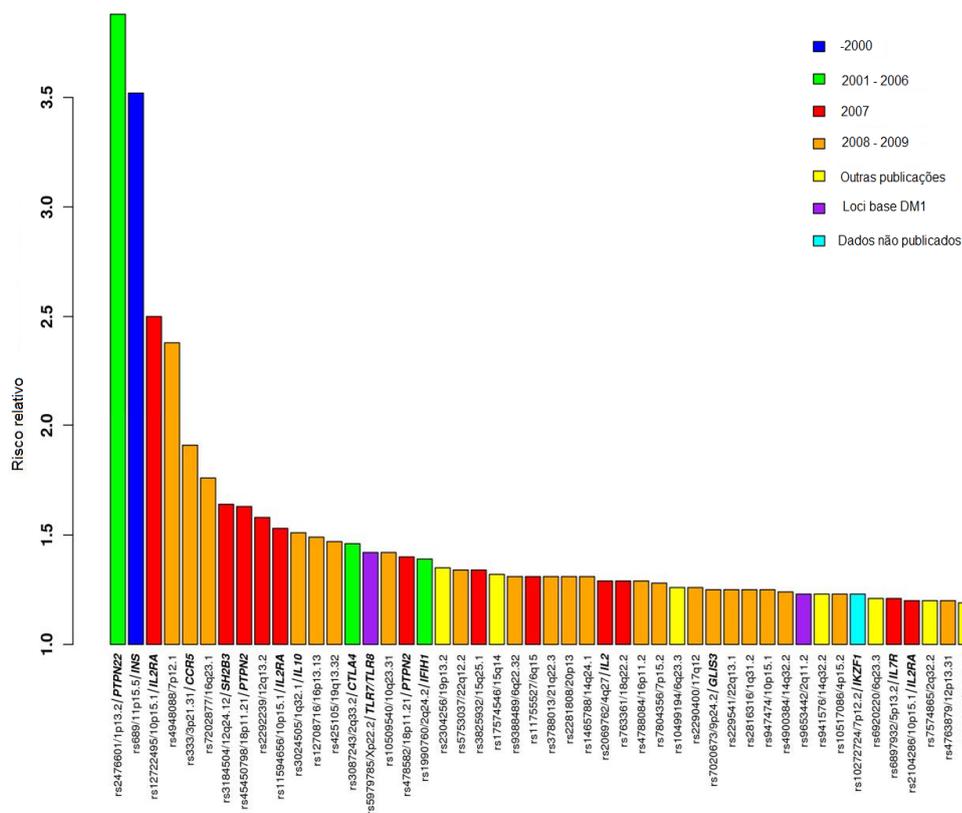
Fonte: Adaptada de Polychronakos; Li, 2011

A contribuição genética dos genes HLA de classe II representa mais de 40% da agregação familiar da doença. Já foi comprovado que indivíduos com DM1 expressam moléculas da resposta imune DR3 e DR4, que estão fortemente ligadas ao gene DQB e seus alelos DQB1 * 0201 e DQB1 * 0302, enquanto que indivíduos no Reino Unido com o alelo DQB1 * 0602 tem menor suscetibilidade, pois o alelo modula a proteção ao desenvolvimento da doença (BARRATT *et al.*, 2004; JAHROMI ; EISENBARTH, 2007).

As combinações de alelos HLA*DR e DQ, dependendo da população em estudo, podem conferir maior ou menor suscetibilidade ao desenvolvimento do DM1. Por exemplo, o haplótipo DRB1 * 1501 - DQA1 * 0102 - DQB1 * 0602 é encontrado em 20% da população, e em apenas 1% dos pacientes, promovendo uma menor suscetibilidade contra a doença (ERLICH *et al.*, 2008). Entretanto, outro estudo realizado no estado do Colorado, Estados Unidos, identificou esse mesmo haplótipo como de risco aumentado de 2,4% dos recém-nascidos, mais de 20% das crianças afetadas, e sua presença representa um risco de 55% de desenvolver diabetes até os 12 anos (ALY *et al.*, 2006).

Logo após o HLA classe II, o locus de segunda maior associação ao desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 1 é de uma região não-HLA, onde localiza-se o gene da insulina (*INS*), no qual o risco está relacionado com uma menor expressão de insulina no timo (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). Outras regiões não-HLA que estão associadas ao surgimento da doença podem ser vistas na figura 4.

Figura 4. Gráfico com estudos de mapeamento de Loci não-HLA como fatores de risco ao Diabetes tipo1



Fonte: Adaptado de Todd 2010.

O tirosinofosfatase não receptor tipo 22 (linfóide) (*PTPN22*), que influencia a sinalização do receptor de células T, é identificado como influência de risco a diabetes (BOTTINI et al., 2004). Outro gene que possui polimorfismos associados com a regulação das células T é o antígeno-4 associado a linfócitos T citotóxicos (*CTLA-4*), e alguns estudos apontam com o menor risco genético influenciando o DM1 (Van Belzen et al., 2004 ;Fife et al., 2006). Variações alélicas no gene do Receptor da Interleucina 2 (*IL2RA*) representa outra região associada e esse receptor é um elemento essencial após ativação das células T (MAIER et al., 2009).

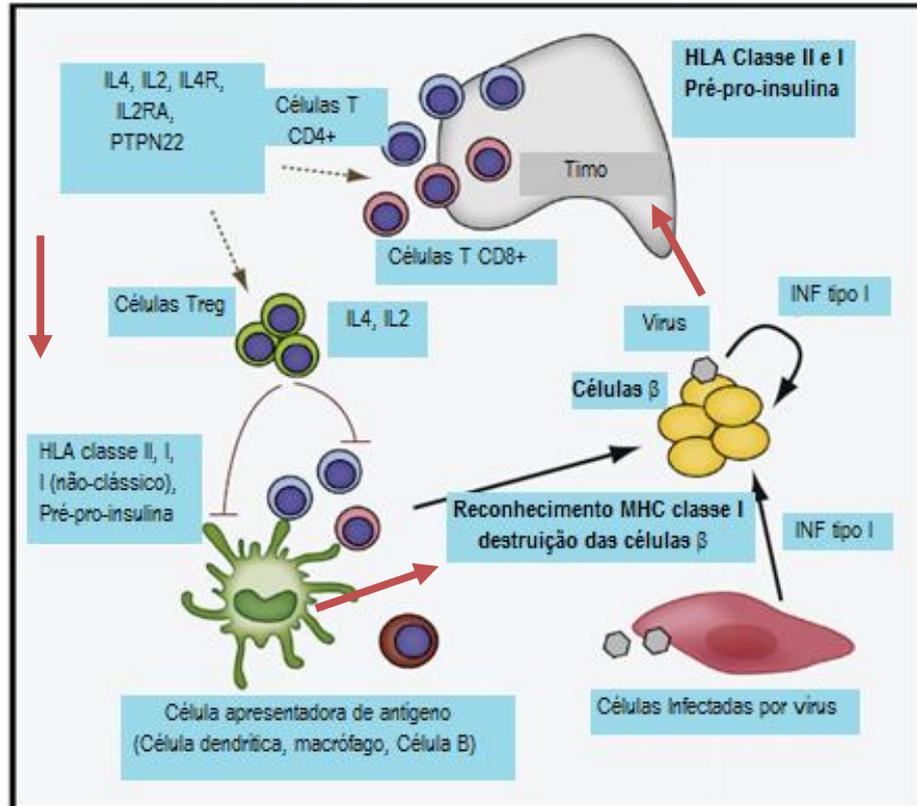
Um outro receptor importante é o Receptor da interleucina 4, que medeia a resposta inflamatória autoimune participando da diferenciação dos linfócitos Th, em conjunto com a interleucina 4 (FLÓREZ *et al.*, 2011).

Ao longo da última década ocorreu uma diversidade de estudos com a finalidade de definir um conjunto de Loci não-HLA influenciando no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 1 e, recentemente, alguns desses forneceram dados de um loci ligado ao HLA, mas não HLA clássico, que pode ter influência sobre a desordem autoimune, como o caso do HLA-G (EIKE *et al.*, 2009).

Embora os mecanismos regulatórios que se destinam à autoimunidade das células estejam estabelecidos, ainda não estão completamente esclarecidos. Importantes fatores genéticos, como o genótipo do HLA classe II e *INS* aumentam a probabilidade de iniciar a processo autoimune nas células, enquanto que os genes não-HLA afetam a evolução da patogênese, no percurso da autoimunidade (LEMPAINEN ; ILONEN, 2012).

Genes que codificam moléculas como PTPN22, CTLA-4, IL18, IL2R e IL4R estão intimamente relacionados à regulação das células T, participando da autoimunidade do DM1 e são essenciais para compreensão da patogênese (LEMPAINEN ; ILONEN, 2012; Nokoff ; REWERS, 2013; TAVARES *et al.*, 2013). Um modelo de patogênese com base genética é representado na figura 5.

Figura 5. Modelo para a patogênese do DM1 com base genética

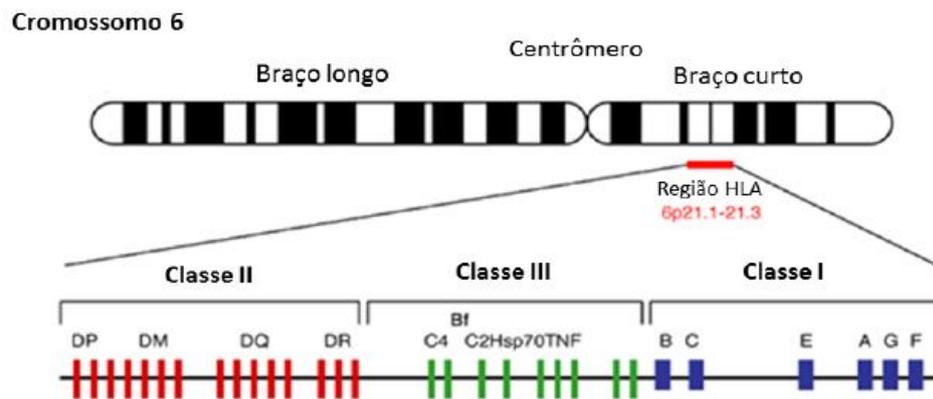


Fonte: Adaptada de Todd 2010.

2.3 O Antígeno Leucocitário Humano e Diabetes Mellitus Tipo 1

A região do HLA está mapeada no cromossomo 6p21.31, estendendo-se numa região do DNA de aproximadamente 4KB que contém, aproximadamente, um conjunto de 200 genes identificados e, apenas alguns desses estão envolvidos na resposta imune, como genes que codificam moléculas de HLA clássicas: classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C), classe II (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP), classe III (TNFs e proteínas do complemento C3 e C4); como também não clássica: classe I (HLA-G, HLA-E), representadas na figura 6 (NOBLE ; ERLICH, 2012).

Figura 6. Representação esquemática da localização de genes da região do HLA no cromossomo 6.



FONTE: MEHRA; KAUR *et al*, 2003

Os representantes das classes I e II são homólogos às proteínas de superfície celular, que se ligam aos peptídeos antigênicos, para apresentá-los as células T. Algumas moléculas se assemelham estruturalmente ao HLA classe I clássico (HLA-E e HLA-G), mas não tem a capacidade de ligar-se aos peptídeos presentes, sendo assim, são conhecidos como HLA não clássicos (ADAMS ; LUOMA, 2013).

A função apresentada dos HLAs clássicos sustenta sua importância tanto na resposta imune ao ambiente, como na autoimunidade. Primeiramente, o HLA foi identificado através do seu papel na rejeição de transplantes, em 1974, e um ano depois se iniciou os estudos de associação em diversas doenças (THORSBY, 1974). Atualmente, o HLA está implicado na etiologia de mais de 100 doenças, que incluem tanto doenças autoimunes como o Diabetes mellitus tipo 1 e Artrite reumatoide, como também doenças não autoimunes tais como, câncer e doenças infecciosas (AIDS e Malária) (LECHLER ; WARRENS 1999; NDUNGU *et al.*, 2005 ; Carpenter *et al.*, 2009; Brandão *et al.*, 2010; NOBLE, 2012).

Estudos de associação com HLA são complicados tanto pelo número de alelos reportados no *locus*, como também pelas variações alélicas entre as populações, onde ocorrem interações epistáticas com outros fatores de

suscetibilidade. Há quatro décadas são realizados estudos de associação do DM1 com genes *HLA*, muitos desses realizados em caucasianos, mas grandes são os avanços para compreensão em populações não caucasianas, nas quais há uma maior heterogeneidade étnica (NOBLE, 2012).

A taxa de recombinação de alelos no HLA, salva algumas exceções, é pequena, podendo resultar em uma herdabilidade em bloco, de uma geração para outra, promovendo a formação de haplótipos com características ancestrais, ou recombinações destes, implicando em grandes regiões do cromossomo extremamente conservadas e, possibilitando a sua utilização como marcadores eficientes no estudo da predisposição dos genes HLA para doenças complexas (BLOMHOFF et al., 2006). Portanto, a caracterização do DM1 pode ser relacionada à combinação dos alelos DRB1, DQA1 e DQB1 (DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01, por exemplo) em cerca de 90% dos casos diagnosticados (ERLICH et al., 2008; NOBLE ; VALDES, 2011).

Estudos com as moléculas do HLA classe II demonstraram que, quando associadas às células apresentadoras de antígenos, ligam-se aos peptídeos de autoantígenos da pre-pro-insulina (PPI) e do antígeno associado à insulinoma (I-A2) apresentando-os aos receptores de antígenos de células T CD4+ no timo e nas ilhotas pancreáticas (TODD, 2010; MALLONE et al., 2011).

Recentemente, moléculas HLA não clássica, como o caso do HLA-G, são alvos de estudos de associação e, interessantemente, foi reportada a expressão constitutiva do HLA-G nas ilhotas pancreáticas, sugerindo um possível papel imunorregulador no processo da autoimunidade (CIRULLI et al., 2006).

2.4 DM1 e os genes do estudo

Os tópicos a seguir referem-se aos genes envolvidos no estudo.

2.4.1 HLA-G

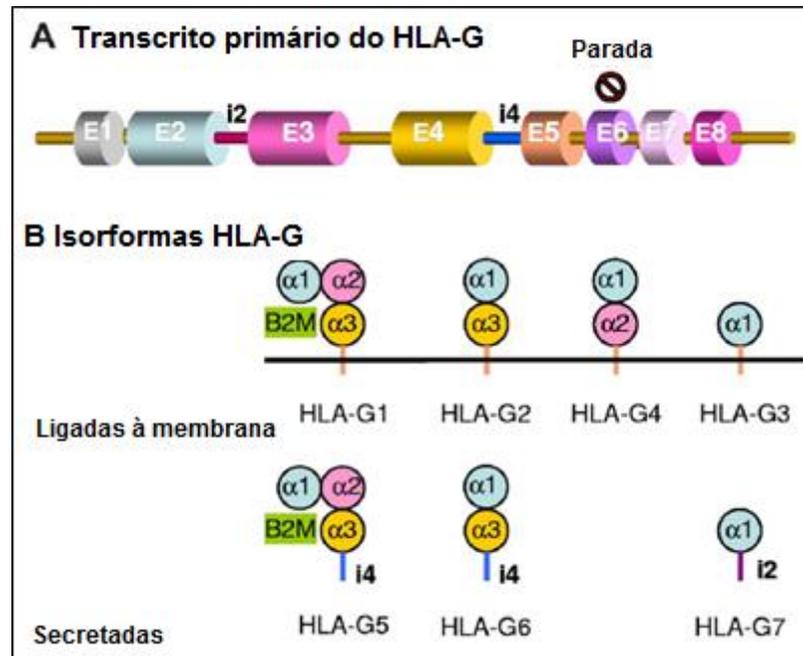
O HLA-G é uma molécula do MHC que apesar de semelhante à classe I, faz parte do HLA não clássico, e são classificados dessa forma por não apresentar antígenos em associação com as APCs, e possuir poucos polimorfismos, ao contrário dos HLA de classe I clássico, que são os mais polimórficos do genoma. Além disso, os polimorfismos genéticos dos HLA classe I encontram-se nos

domínios globulares 1 e 2, diferentemente do HLA-G, que apresenta seus polimorfismos distribuídos ao longo dos três domínios globulares 1, 2 (transmembrânicos) e 3 (citoplasmático) (VEIT *et al.*, 2010; PISTOIA *et al.*, 2007).

As proteínas do HLA-G podem ser geradas por sete diferentes isoformas a partir de *splicing* alternativo. Quatro delas são ligadas à membrana (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4), enquanto que as outras três são formas solúveis (HLA-G5, -G6, -G7) (CAROSELLA *et al.*, 2008). Todas as isoformas apresentam pelo menos o domínio 1 que é originado do éxon 1. A isoforma HLA-G1 é a única derivada da tradução total do HLA-G transcrito, possuindo todos os domínios (1, 2 e 3), enquanto que nas isoformas G5 a G7, os domínios transmembrânicos e citoplasmático não são traduzidos devido à permanência do íntron 4 no RNA mensageiro (mRNA) (HLA-G5 e HLA-G6), e do íntron 2 (HLA-G7), resultando nas formas solúveis (PISTOIA *et al.*, 2007).

A permanência desses íntrons introduz um códon de parada no éxon 6, assim, o HLA-G apresenta uma cauda citoplasmática menor que as existentes em HLA-A, HLA-B e HLA-C, o que determina importantes implicações na expressão do HLA-G, pois irá proporcionar uma expressão prolongada da molécula na superfície celular, em comparação com as moléculas de HLA clássicas (PISTOIA *et al.*, 2007; CAROSELLA *et al.*, 2008; VEIT *et al.*, 2010). Na figura 7 são mostrados os *splicings* alternativos e as isoformas geradas.

Figura 7. Processamento alternativo e isoformas do HLA-G.



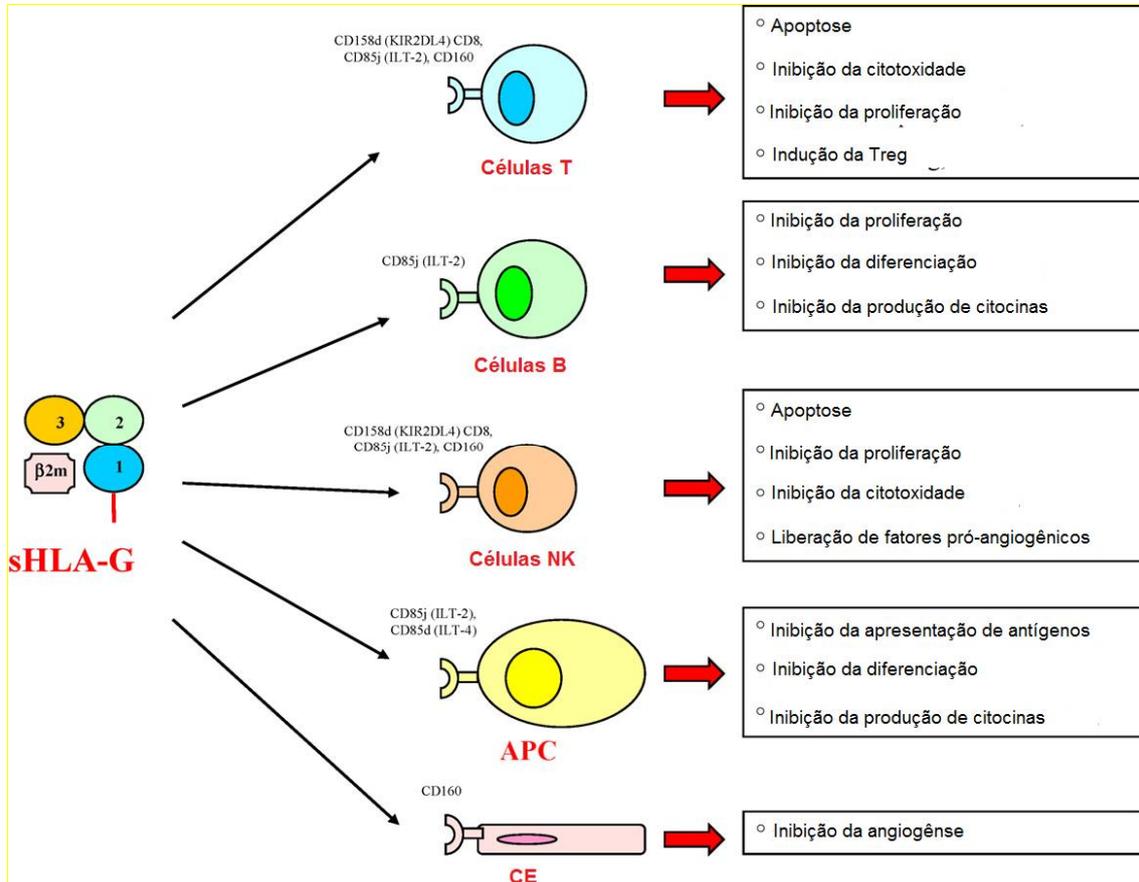
Fonte: Adaptada de Carosela et al., 2008.

Até recentemente, pensava-se que o HLA-G era expresso fisiologicamente em células fetais (trofoblastos) e não em células adultas. Devido a isso, foram realizadas diversas investigações que questionavam a fisiologia em células adultas. Dessa forma, foi descoberto que em condições não patológicas, o HLA-G pode ser expresso por precursores de eritrócitos, endoteliais e mesenquimais (Carosella *et al.*, 2008). Além disso, foi demonstrando também que em condições patológicas, como transplantes, doenças inflamatórias, células tumorais, esclerose múltipla e infecções virais, a expressão do HLA-G pode ser induzida. Através dessas investigações puderam concluir que a expressão dessa molécula é restrita a determinados tecidos (PISTOIA *et al.*, 2007; CAROSELLA *et al.*, 2008).

Funcionalmente, o HLA-G desempenha um papel importante na regulação do sistema imune, por ser uma molécula imunossupressora e também tolerogênica (CAROSELLA, 2011). Estudos revelaram que estas funções imunossupressoras foram observadas nas moléculas HLA-G solúveis, especialmente HLA-G1 e G5, entretanto, as outras isoformas são menos conhecidas por existirem poucos estudos, com exceção das isoformas HLA-G2, G3 e G4 ligadas à membrana, que podem inibir células NK e células T citotóxicas (RITEAU *et al.*,

2001). As funções já conhecidas do HLA-G, bem como em quais células atuam, estão sumarizadas na figura 8.

Figura 8. Atividades imurregulatórias mediadas por sHLA-G envolvendo as células e receptores indicados.



Fonte : Adaptado de Pistoia et al., 2007.

O estudo da expressão do HLA-G em doenças inflamatórias é relativamente recente. Inicialmente, sua expressão foi avaliada em dermatite atópica e miopatias inflamatórias e com base nas primeiras pesquisas, observou-se que o HLA-G poderia desviar a resposta T helper para o tipo Th2, levantando a hipótese que seria uma molécula protetora nas respostas inflamatórias (WIENDL *et al.*, 2000; KHOSROTEHRANI *et al.*, 2001). Outro estudo abordando a associação genética identificou uma possível influência de polimorfismos do HLA-G em esclerose múltipla, mas não foi encontrada associação (KRONER *et al.*, 2007). Polimorfismos na região promotora e também na 3ª região não traduzida (UTR) foram implicados na susceptibilidade à asma (TAN *et al.*, 2007).

Na literatura também são encontrados estudos de associação e funcionamento do gene em questão com doenças causadas por infecções virais. Foi realizado um estudo com crianças brasileiras, associando a transmissão vertical do HIV e o indel 14 pb do gene HLA-G com um risco reduzido de transmissão (FABRIS *et al.*, 2009). Avaliando indivíduos brasileiros e italianos infectados com HIV e co-infectados com o vírus da hepatite C sugeriu que o HLA-G tem um potencial papel na suscetibilidade à doença (SILVA *et al.*, 2014). Um estudo com o Papiloma vírus humano (HPV), basea-se na hipótese da re-expressão do HLA-G no mecanismo viral, tornando-se primordial no desenvolvimento de lesões no colo do útero, mas não foi encontrada associação (GILLIO-TOS *et al.*, 2012). Estudo funcional relacionando o HLA-G e a infecção aguda pelos vírus do Herpes e o vírus da Raiva, verificou que esses vírus podem regular a expressão do HLA-G em células neuronais humanas, podendo assim estar envolvido com o escape de alguns vírus na resposta imune no sistema nervoso (LAFON *et al.*, 2005).

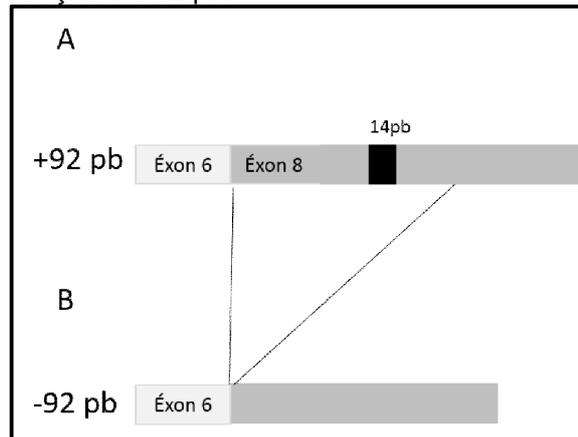
Atualmente, estudos de varredura genômica (*genomewidescan*) estão ganhando muito destaque na investigação e descobertas de alelos e regiões relacionadas à susceptibilidade genética para doenças autoimunes. Uma análise completa da região MHC, com indivíduos portadores de DM1, colocou o HLA-G na lista principal de genes candidatos para a susceptibilidade (EIKE *et al.*, 2009). O polimorfismo de 14 pb é um dos mais estudados e relacionados com doenças autoimunes como lúpus (RIZZO *et al.*, 2008) e artrite reumatóide (VEIT *et al.*, 2008).

O polimorfismo de inserção/deleção (indel) de 14 pb do gene HLA-G está localizado na posição +2960 (rs66554220), no éxon 8, da região 3'UTR, e apresenta um papel no *splicing* alternativo e na estabilidade do seu mRNA (ROUSSEAU *et al.*, 2003).

O alelo da inserção do indel 14pb está associado com uma baixa produção de mRNA, e, de certa forma, com os níveis mais baixos de HLA-G solúvel (sHLA-G) (HVIID *et al.*, 2003). Essa alteração na quantidade de transcritos produzidos acontece, pois o transcrito primário do gene HLA-G com a inserção da sequência de 14 pb (5'ATTGTTTCATGCCT-3') pode sofrer uma etapa adicional de *splicing alternativo* que retira 92 pb da região onde a sequência 14pb está localizada (HVIID *et al.*, 2003; ROUSSEAU *et al.*, 2003). Esse processamento alternativo adicional foi evidenciado em análises *in vitro*, demonstrando que a inserção de 14pb parece aumentar a instabilidade do mRNA, uma vez que os transcritos com 92pb

deletados mostraram-se mais estáveis (figura 9) (ROUSSEAU *et al.*, 2003; VEIT *et al.*, 2010).

Figura 9. *Splicing* alternativo removendo 92 pb do mRNA do gene HLA-G. (A) Transcrito completo com os 92 pb inseridos na sequência, (B) transcrito com a deleção dos 92 pb.



FONTE: A autora

Diante do exposto, observa-se que a inserção de 14pb na região 3'UTR do gene HLA-G mostrou-se associada com a baixa expressão de mRNA e a baixa concentração sérica de HLA-Gs, o que foi denominado de paradoxo do polimorfismo 14 pb, sugerindo o envolvimento de mecanismos complexos de regulação da expressão do HLA-G, tais como o envolvimento de microRNAs (CHEN *et al.*, 2008; VEIT ; CHIES, 2009; CASTELLI *et al.*, 2010).

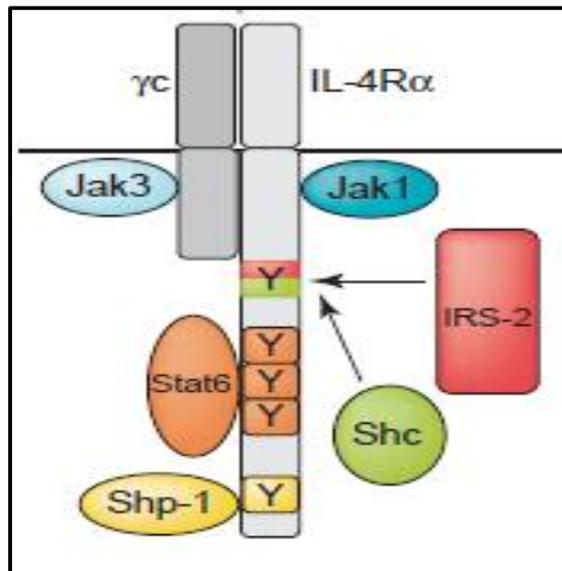
Muitos estudos de associação analisam o polimorfismo indel de 14 pb do gene HLA-G com diferentes tipos de patologias. Recentemente, Fabris *et al.* (2011) mostrou associação entre a inserção de 14 pb e a doença celíaca, e indicou que era um fator de risco para doença. Glaset *et al.* (2007) encontrou associação entre a deleção de 14pb e a colite ulcerativa, e esse foi apontado como um fator de risco para o desenvolvimento da doença. Associações com a inserção em maior frequência em pacientes do que em controles foram observadas com a sarcoidose (HVIID *et al.*, 2006) e com a doença de Behcet (Park *et al.*, 2007).

Apesar da diversidade de estudos com o polimorfismo indel 14 pb, ainda não há estudos de associação que relacionem esse polimorfismo e o diabetes mellitus tipo 1. Apenas Cirulliet *al* (2006) reportou a expressão constitutiva do HLA-G nas ilhotas pancreáticas.

2.4.2 IL4R

O receptor de IL4 representa um complexo transmembranar composto de pelo menos duas proteínas diferentes, a cadeia comum γ_c , partilhada por vários receptores de interleucina, amplifica o sinal transduzido pela IL-4R α (uma cadeia de ligação 140 kDa alta afinidade). A cadeia alfa liga-se a IL-4 e medeia o seu efeito através de quinases da família Janus (proteínas pertencentes às enzimas associadas a receptores de citocinas) ligada ao domínio intracelular (NELMSet al.,1999). A estrutura da IL4R pode ser mostrada em detalhes na figura 10.

Figura 10. Ilustração esquemática do complexo do IL4R.



Fonte: Chatila, 2004.

A IL4R induz a mudança de classe do isotipo de imunoglobulina G (IgG) para a produção de IgE em células B, assim, estimula a proliferação dessas células, induzindo a diferenciação de T helper. O IL4R contribui na resposta inflamatória autoimune mediada por Th1 e o desequilíbrio na proporção de Th1 para Th2 na resposta imune adaptativa ocorre numa variedade de distúrbios das respostas imunes, incluindo o DM1 (IVANSSON et al., 2007).

IL4R situa-se no braço curto do cromossomo 16p12.1. Muitos polimorfismos foram descritos nas regiões codificadora e não codificadora do gene (Deichmann et al., 1997). Foi estabelecido que os polimorfismos situados na posição + 148 (transição A / G, I50V; rs1805010) da região codificadora do domínio extracelular

afeta a ligação da IL4, e na posição + 1902 (transição A/G, G576A; rs1801275) da região codificadora do domínio intracelular, desregula a sinalização intracelular (MITSUYASU *et al.*, 1998; NELMS *et al.*, 1999).

A variante rs1805010 do domínio extracelular aumenta a regulação, de forma significativa, da resposta do receptor de IL4, além de aumentar a proliferação celular, e a produção de IgE (STEPHENSON *et al.*, 2004). O efeito anti-inflamatório de IL4 é mais pronunciado na presença de variantes mutantes do gene *IL-4R* (SHIRAKAWA *et al.*, 2000).

A *IL4R* já foi associada com artrite reumatoide, em que sua atividade medeia o efeito da IL4 (RAZA *et al.*, 2005). Prot *et al* relataram uma associação entre o polimorfismo rs1805010 do *IL4R* e a presença de erosões ósseas em pacientes com tempo de 2 anos de evolução da doença (PROTS *et al.*, 2006). Estudos de associação com diabetes mellitus tipo 1 são divergentes. Qu *et al.*, (2006) reportou a falta de associação entre os polimorfismos rs1805010, rs1805011, rs1805013, rs1805015 e rs1801275 e o diabetes mellitus tipo 1 (QU *et al.*, 2006). Outro estudo com os polimorfismos rs1805010, rs1805011, rs1805015 relatou a associação dos genótipos, bem como das combinações haplotípicas (STECK *et al.*, 2005).

2.5 Polimorfismos genéticos

Um dos principais adventos do projeto Genoma Humano foi a descoberta de milhões de variações ao longo do DNA, nas quais grande parte refere-se a modificações pequenas no genoma humano, como o caso das inserções, deleções e SNPs (KWOK, 2001). Essas variações funcionam como importantes marcadores genéticos, e atualmente, são utilizado em estudos de associação genética, podendo revelar grande importância na predisposição a uma diversidade de infecções e doenças autoimunes (BRAIDA *et al.*, 2004; SCHWARTZ *et al.*, 2004).

Essas variações também conhecidas como polimorfismos genéticos podem também alterar ou não, a expressão gênica, a síntese proteica, o enovelamento proteico e, conseqüentemente, a atividade da proteína codificada, e tais modificações irão depender da localização da variação ao longo do genoma humano, já que as mesmas podem ser encontradas em regiões não codificantes

apenas ocasionando mudanças sinônimas (NOWOTNY et al., 2001; KIM; MISRA, 2007).

O genoma humano é formado por regiões gênicas intercaladas por regiões intergênicas. Os genes são estruturas formadas por DNA e estão organizados em éxons e íntrons. Para transmitir sua informação genética, esses genes são transcritos em moléculas de RNA primário, no qual ainda se mantém os éxons e íntrons. Através do processamento alternativo (*splicing* alternativo), que envolve a adição de CAP 5' e cauda poli A (na extremidade 3') os íntrons são retirados e o RNA mensageiro primário, torna-se maduro. No primeiro e no último éxon do RNA mensageiro maduro existe uma porção que não é traduzida em aminoácidos denominada de UTR. Essa região apresenta papel primordial na tradução das proteínas (GRIFFITHS et al, 2013).

Uma variação genética nas regiões UTRs do gene pode alterar a síntese protéica, uma vez que, polimorfismos nesta porção podem aumentar ou diminuir a afinidade dos ligantes envolvidos na tradução com conseqüente alteração na produção das proteínas (GRIFFITHS et al, 2008; SNUSTAD; SIMMONS, 2008). Como o caso do indel 14pb, contido na 3'UTR e estudado no presente trabalho, que está relacionado com a estabilidade do mRNA e por conseqüência, com a produção da proteína; por apresentar uma função imunorregulatória torna-se importante nos estudos de associação com doenças autoimunes. Bem como os SNPs do gene *IL4R* nas regiões codificadoras (éxons) que podem resultar em proteínas modificadas, podendo aumentar ou diminuir sua atividade regulatória em células imunológicas (SOBRINO et al., 2004).

Assim, nos últimos anos, um grande número de tecnologias diferentes tem permitido a genotipagem individual desses polimorfismos, permitindo através de estudos de associação, identificar contribuições poligênicas em doenças complexas como o diabetes mellitus tipo 1.

Com o objetivo de avaliar variações genéticas e a suscetibilidade ao DM1, este presente trabalho selecionou através de busca na literatura e nos bancos de dados de consórcios, polimorfismos que afetam os níveis protéicos do HLA-G e *IL4R*, genes com funções regulatórias em células do sistema imunoenvolvidas na etiopatogênese do DM1.

3 Objetivos

A seguir os tópicos explicitando os objetivos do trabalho.

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação do polimorfismo 14pb inserção/ deleção do gene *HLA-G* e de polimorfismos de único nucleotídeo do gene *IL4R* em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1 do estado de Pernambuco, a fim de identificar possíveis marcadores genéticos associados à proteção e/ou susceptibilidade ao DM1.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar as frequências alélicas e genótípicas dos pacientes e controles, assim como dos grupos de pacientes estratificados;
- Analisar a frequência do polimorfismo 14pb do gene *HLA-G* em pacientes com Diabetes mellitus tipo 1 e em indivíduos saudáveis;
- Avaliar a associação dos polimorfismos rs2243250, rs1805016, rs1805015, rs1805013, rs1805011, rs1805010, rs1801275 do *IL4R* em pacientes com Diabetes mellitus tipo 1 e em indivíduos saudáveis;
- Analisar os SNPs, após estratificação, de acordo com a presença ou ausência da tiroidite autoimune (AITD) e/ou doença celíaca (DC) nos pacientes, em comparação com controles saudáveis.
- Avaliar a existência de uma correlação dos polimorfismos do *HLA-G* e *IL4R* com a idade de diagnóstico do DM1.

4 Material e Métodos

4.1 Grupo de estudo

Foram analisadas amostras de DNA Genômico de 174 pacientes DM1 diagnosticados de acordo com os critérios clínicos da Associação Americana de diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). A idade média foi de 13 anos (desvio padrão ± 4.8) e as amostras foram obtidas pelos três maiores centros de endocrinologia pediátrica do serviço de saúde pública do Recife, na região Nordeste do Brasil (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Hospital da Restauração e Hospital das Clínicas - UFPE).

O grupo dos controles consistiu de 181 indivíduos saudáveis sem histórico familiar de outras doenças autoimunes. A idade média foi de 32 anos (desvio padrão ± 13.3) baseada no fato de que a maioria dos indivíduos portadores de DM1 desenvolvem a doença ainda na primeira infância. Todos os controles foram provenientes da mesma região geográfica dos pacientes. Um consentimento livre esclarecido foi obtido de todos os indivíduos incluídos neste estudo que foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética local (IMIP número 1717/2010).

4.2 Extração de DNA genômico

Após a coleta de aproximadamente 5mL de sangue periférico por indivíduo, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE). O DNA genômico foi isolado a partir das células do sangue periférico, anticoagulado com EDTA, de cada paciente e indivíduo controle seguindo as instruções do fabricante do Kit de extração de DNA *Wizard Genomic Purification Kit* (PROMEGA).

4.3 Diagnóstico de Tireoidite autoimune e Doença celíaca

O diagnóstico dos anticorpos para tireoperoxidase (Anti- TPO) foram realizados por quimioluminescência (Immulate anti-TPOAb, Produtos de diagnóstico Co, Los Angeles, EUA). Pacientes com anti- TPO positivo (título superior a 35 UI/ml,

de acordo com a sugestão do fabricante) foram considerados como pacientes portadores de tireoidite, considerados em nosso estudo como AITD+.

Os anticorpos anti-transglutaminase (anti-tTG) foram determinados usando o kit de ELISA Eu-tTG (Eurospital, Trieste, Itália), de acordo com as instruções do fabricante. Os pacientes que apresentaram 10 UA (unidades de absorvância) de anticorpos anti-tTG foram considerados positivos para doença celíaca e, subsequentemente, foram rastreados para a presença dos haplótipos HLA DQ2 e / ou DQ8 utilizando o kit de Eu-DQ (Eurospital, Trieste, Itália). Após uma dieta livre de glúten, autoanticorpos tTG de todos os pacientes com DC diminuíram e permaneceram sob o valor de corte (7 UA).

4.4 Estratificação dos pacientes

Baseado na presença de outras doenças endócrinas autoimunes, diagnosticadas no grupo de pacientes DM1, esses indivíduos também foram analisados pela presença dessas outras patologias. Sendo assim, pacientes DM1 diagnosticados apenas com Tireoidite autoimune (AITD+) e sem a presença de Doença celíaca (DC-) foram classificados com a sigla DM1+AITD+DC-. Aqueles diagnosticados apenas com Doença celíaca e sem Tireoidite autoimune foram classificados como DM1+AITD-DC+. Os que apresentaram as três doenças foram os DM1+AITD+DC+, enquanto que os diagnosticados apenas com diabetes tipo 1, foram classificados como DM1+AITD-DC-. Dessa maneira, os grupos estratificados serão dispostos nas tabelas dos resultados com suas respectivas siglas.

4.5 Genotipagem dos indivíduos e construção de haplótipos

4.5.1 Seleção dos polimorfismos

A seleção dos polimorfismos candidatos foi baseada através de busca na literatura e nos bancos de dados do *National Center Biotechnology Information* (NCBI), com frequência do alelo minoritário (MAF) de pelo menos 5% nas populações caucasiana (CEU) e afrodescendente (YRI).

4.5.2 Gene HLA-G

O polimorfismo selecionado do gene HLA-G foi o indel rs66554220- 14pb deleção (D) / inserção (I) e um total de 174 pacientes e 143 controles saudáveis foram genotipados. A genotipagem foi realizada a partir de ensaios da reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com o protocolo de Linet *al.*, 2007, utilizando os *primers* selecionados (tabela 3), em um volume de reação de 25ul contendo 2,5ul de Buffer [10x], 1,5ul de MgCl₂ [25mM], 2ul de dNTPs [10mM], 0,2ul de Taq [5U/ul], 2 ul de DNA [25ng/ul] e 0,5ul de cada *primer* [10uM].

Tabela 3. Lista com as sequências dos *primers* para o indel 14 pb

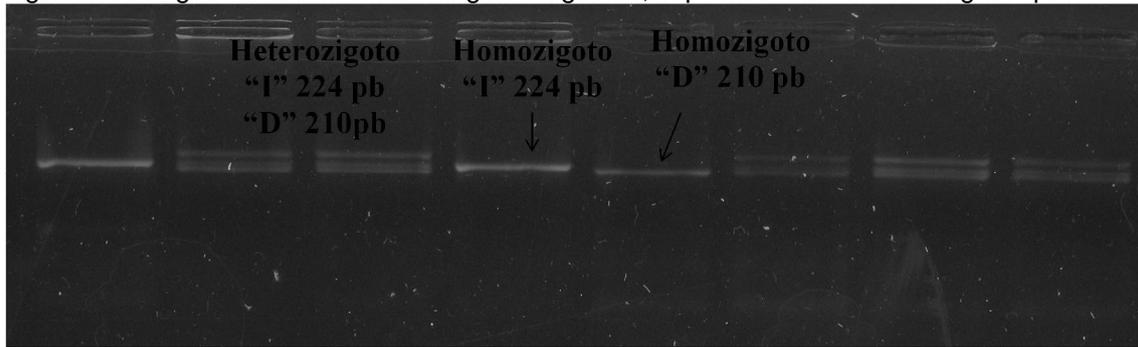
Polimorfismos	Primers	Sequência
Indel 14 pb rs66554220	Fw	GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTCACC
	Rev	GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA

FONTE: A autora

O seguinte protocolo de ciclagem foi utilizado: um ciclo por 10 minutos a 95°C; 40 ciclos por 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 58°C e 45 segundos a 72°C e, um ciclo final de 7 minutos a 72°C. Todas as reações foram realizadas no termociclador Life Express ThermalCycle (Bioer, China) no laboratório de Biologia Molecular, LIKA- UFPE.

Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 3%, através do sistema de detecção de fotodocumentador digital (Labtrade, Brasil), permitindo a genotipagem dos pacientes e controles. Para interpretação dos genótipos, as bandas foram comparadas com Ladder 100pb (Invitrogen). As amostras que apresentaram apenas uma banda de 224pb foram consideradas homozigotas para a inserção; as amostras que apresentaram apenas uma banda de 210pb, como homozigotas para a deleção e, aquelas que apresentaram as duas bandas foram consideradas heterozigotas (Figura 11).

Figura 11. Imagem de eletroforese em gel de agarose, especificando as bandas genotipadas.



FONTE: A autora

4.5.3 Gene IL4R

Para a genotipagem dos SNPs selecionados (rs1805016, rs1805015, rs1805013, rs1805011, rs1805010, rs1801275) do gene *IL4R* foram utilizadas sondas alelo específicas fluorescentes (TaqMan®, Life) utilizando a plataforma em tempo real ABI-7500 (Life Technologies) e um total de 171 pacientes e 181 controles saudáveis. O desequilíbrio de ligação e os haplótipos foram computados usando o Haploview 4.2 e o SNPstats ([http://bioinfo.iconcologia.net/SNP stats](http://bioinfo.iconcologia.net/SNP_stats)).

4.6 Métodos Estatísticos

Para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, realizar o teste exato de Fisher, bem como calcular as frequências alélicas e genóticas dos grupos em estudo, foi utilizado o programa R (2005; version 2.1.1; <http://www.r-project.org/>). Com esses testes avaliamos também a susceptibilidade do DM1 com a presença de outras doenças autoimunes. OddsRatio (OR) foi calculado, considerando 95% de intervalo de confiança (IC). Em todas as análises, $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 Resultados

No presente estudo, todos os pacientes DM1 foram também diagnosticados para a presença de tireoidite e/ou doença celíaca. Após a estratificação, foram observados que 23% apresentavam DM1+AITD+DC-, 5% foram classificados como DM1+AITD-DC+, enquanto que 3,6% foram diagnosticados como DM1+AITD+DC+, e os 68,4% restantes não apresentaram outras doenças autoimunes.

5.1 Indel 14 pb do gene *HLA-G*

As frequências genótípicas do indel 14 pb do gene *HLA-G* estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto para os pacientes DM1 como indivíduos controles. O indel de 14 pb (rs66554220) apresentou o alelo D mais frequente entre os pacientes (73%), enquanto o alelo I não apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles (27%; 33%, respectivamente). Quanto aos genótipos, o D/D foi mais frequente no grupo dos pacientes (52%). Em relação á estratificação dos pacientes para a presença de AITD e DC, o alelo D foi mais frequente em todos os grupos sendo o mesmo observado para o genótipo DD. As distribuições das frequências alélicas e genótípicas de todos os grupos estão dispostas na tabela 4.

Tabela 4. Frequências alélicas e genótípicas do indel 14 pb nos controles e pacientes DM1 estratificados de acordo com a insurgência de Tireoidite autoimune (AITD) e Doença celíaca (DC).

14 pb(rs66554220)	Controles	DM1	DM1+AITD-DC-	DM1+AITD+DC-	DM1+AITD-DC+	DM1+AITD+DC+
Alelos	n=286 (%)	n=348 (%)	n=238 (%)	n=80 (%)	n=18 (%)	n=12 (%)
D	192 (67%)	255 (73%)	169 (71%)	60 (75%)	15 (83%)	11 (92%)
I	94 (33%)	93 (27%)	69 (29%)	20 (25%)	3 (17%)	1 (8%)
Genótipos	n=143 (%)	n=174 (%)	n=119 (%)	n=25 (%)	n=9(%)	n=6 (%)
DD	66 (46%)	90 (52%)	57 (48%)	22 (55%)	6 (67%)	5 (83%)
DI	60 (42%)	75 (43%)	55 (46%)	16 (4%)	3 (33%)	1 (17%)
II	17 (12%)	9 (5%)	7 (6%)	2 (0,5%)	0	0

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa na distribuição do genótipo I/I, mostrando-se mais frequente entre os controles (12%) em relação aos pacientes (5%) ($p=0,028$; $OR=0,39$; $IC95\%= 0,16-0,92$). O genótipo DI não mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas distribuições dos alelos e genótipos dos grupos de pacientes quando comparados com os controles (Tabela 5). Adicionalmente, nos grupos AITD-DC+ e AITD+DC+ não foram observadas a presença do genótipo I/I (Tabela 4).

Tabela 5. *p*-value obtido por meio do teste exato de Fisher comparando as frequências alélicas e genotípicas do HLA-G 14bp inserção / inserção entre os grupos.

14pb rs66554220 alelo	DM1 vs controles		AITD - DC- vs controles		AITD + DC- vs controles		AITD- DC+ vs controles		AITD+ DC+ vs controles	
	P value	OR (IC 95%)	p value	OR (IC 95%)	p value	OR (IC 95%)	p value	OR (IC 95%)	p value	OR (IC 95%)
D		Ref		ref		Ref		Ref		ref
I	0,0910,74	(0,53 . 1,05)	0,341,19	(0,81-1,77)	0,211,46	(0,81-2,72)	0,192,44	(0,66-13,47)	0,115,36	(0,75-234,0)
Genótipo										
DD		Ref		ref		Ref		Ref		ref
DI	0,4710,92	(0,58 . 1,46)	0,891,06	(0,61-1,82)	0,580,80	(0,35-1,76)	0,50,55	(0,08-2,72)	0,220,22	(0-2,06)
II	0,0280,39	(0,16-0,92)	0,170,47	(0,15-1,32)	0,230,35	(0,03-1,69)	0,030	(0-0,98)	10	(0-43,52)

Através do modelo recessivo, observamos que o genótipo I/I está associado com a idade do diagnóstico ($p=0,029$) (Tabela 6).

Tabela 6. P-value obtido com a correlação da idade do diagnóstico dos pacientes DM1.

Codominante	n	Me ID	Dif IC	p-value
D/D	90	13,77	0	0,088
D/I	75	13,48	-294	
I/I	9	10,03	-3,739	
Dominante				
D/D	90	13,77	0	0,3697
A/I-I/I	84	31,11	-0,664	3
Recessivo				
D/D-D/I	16			
	5	13,64	0	0,029
I/I	9	10,03	-3,605	

Dif IC= diferença do intervalo de confiança

5.2 SNPs do gene *IL4R*

As frequências genotípicas de todos os polimorfismos do gene *IL4R* estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos pacientes DM1 e controles saudáveis, com exceção do grupo controle para o SNP rs1805015.

- rs1805010

O SNP (rs1805010; I50V), variação de adenina (A) para guanina (G), apresentou o alelo A como mais frequente entre os controles (52%) e o alelo G entre os pacientes (49%) (tabela 7), e uma distribuição semelhante foi observada nos grupos dos pacientes estratificados, com exceção do grupo AITD+DC+ no qual o alelo G foi mais frequente (58%) (tabela 8).

Com relação aos genótipos, a presença do AG foi mais frequente nos pacientes, controles e nos grupos dos pacientes estratificados (tabela 7 e 8). O genótipo AA não foi apresentado no grupo AITD+DC+ e o GG no grupo AITD-DC+ (tabela 7). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas e genotípicas (tabela 7 e 8).

- rs1805011

Para o SNP rs1805011, mudança de adenina (A) para citosina (C), o alelo A apresentou maior frequência nos dois grupos e nos estratificados. Quanto à distribuição genotípica, o genótipo A/A predominou nos pacientes e nos demais

grupos (tabela 7 e 8). As distribuições não mostraram diferenças significativas (Tabela 8 e 9).

- rs1805013

Na troca de citosina para timina no SNP rs1805013, a predominância foi do alelo C, nos pacientes foi de 97,6%, o mesmo alelo predominou entre os demais grupos. Já alelo T foi mais frequente nos controles (4,5%). O genótipo C/C foi o mais frequente em todos os grupos, estando presente em 95,3% dos pacientes. Interessantemente, o genótipo T/T não foi observado na população (Tabela 7 e 8). Diferenças estatisticamente significativas entre as distribuições não foram encontradas (Tabela 7 e 9).

- rs1805015

Para o SNP rs1805015, com a troca de uma citosina para timina, o alelo T foi mais frequente e, pacientes (81%) e controles (81%) apresentaram a mesma frequência. Nos demais, o grupo AITD+DC- (88%) apresentou a maior frequência do alelo. O genótipo TT esteve mais frequente nos controles (68%) e nos pacientes AITD+DC- (76%). Já o genótipo CC não foi observado nos grupos dos pacientes AITD+DC+ e AITD+DC (tabela 7 e 8). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Tabela 7 e 9).

- rs1805016

O SNP rs1805016, com a mudança de uma guanina para timina, o alelo T se apresentou mais frequente em todos os grupos. Nos genótipos, o TT mostrou-se mais frequente nos pacientes (80%) do que nos controles (77%), e nos demais grupos também foi o genótipo mais observado. Enquanto que o GG não foi encontrado nos controles e nos grupos AITD+DC+ e AITD-DC+ (tabela 7 e 8). Não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 7 e 9).

- rs1801275

Por fim, o SNP rs1801275, com a troca de adenina para guanina, apresentou maior frequência alélica no alelo A em todos os grupos. O genótipo AA mostrou-se mais frequente nos pacientes (46%) e nos demais grupos dos pacientes, com exceção do AITD-DC+ que o AG (43%) mostrou-se mais frequente (tabela 7 e 8). Não houve diferenças estatisticamente significantes (tabela 7 e 9).

Tabela 7. Frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos do gene *IL4R* dos pacientes DM1 e controles.

rs1805010	pacientes n= (%)	controle n=(%)	OR (IC 95%)	p-value
Alelos				
A	173 (51%)	190 (52%)	Ref	Ref
G	169 (49%)	172 (48%)	1,07 (0,79 - 1,46)	0,65
Genótipos				
AA	47 (27,5%)	52 (28,7%)	0,98 (0,57 - 1,67)	1
AG	79 (46,2%)	86 (47,5%)	Ref	Ref
GG	45 (26,3%)	43 (23,8%)	1,13 (0,65 - 1,97)	0,692
rs1805011				
Alelos				
A	264 (77%)	281 (78%)	Ref	ref
C	78 (23%)	81 (22%)	1,02 (0,70 - 1,48)	0,928
Genótipos				
AA	103 (60,2%)	111 (61,3%)	Ref	ref
AC	58 (34%)	59 (32,6%)	1,05 (0,65 - 1,70)	0,818
CC	10 (5,8%)	11 (6,1%)	0,97 (0,35 - 2,66)	1
rs1805013				
Alelos				
C	334 (98%)	346 (96%)	Ref	ref
T	8 (2%)	16 (4%)	0,51 (0,18 - 1,30)	0,148
Genótipos				
CC	163 (95,3%)	165 (91%)	Ref	ref
CT	8 (4,7%)	16 (9%)	0,50 (0,18 - 1,29)	0,141
TT	0	0	0 (0 - inf)	1
rs1805015				
Alelos				
C	64 (19%)	69 (19%)	0,95 (0,63 - 1,42)	0,846
T	278 (81 %)	293 (81%)	Ref	ref
Genótipos				
CC	5 (3%)	11 (6%)	0,45 (0,12-1,48)	0,198
CT	54 (31%)	47 (26%)	1,11 (0,68-1,83)	0,721
TT	112 (66%)	123 (68%)	Ref	ref
rs1805016				
Alelos				
G	38 (11%)	42 (11%)	0,90 (0,55-1,48)	0,722
T	304 (89%)	320 (89%)	Ref	ref
Genótipos				
GG	3 (2%)	0	3,05 (0,24-161,9)	0,37
GT	32 (18%)	42 (23%)	0,77 (0,45 - 1,34)	0,356
TT	136 (80%)	139 (77%)	Ref	ref
rs1801275				
Alelos				
A	230 (67,2%)	237 (65,5%)	Ref	ref
G	112 (32,8%)	125 (34,5%)	0,92 (0,66 - 1,27)	0,632
Genótipos				
AA	79 (46%)	79 (43,6%)	Ref	ref
AG	72 (42%)	79 (43,6%)	0,91 (0,56 - 1,45)	0,733
GG	20 (12%)	23 (12,7%)	0,87 (0,41 - 1,80)	0,732

Tabela 8. Distribuição das frequências alélicas e genóticas de polimorfismos do gene IL4R de pacientes DM1 estratificados de acordo com a insurgência de tireoidite autoimune (AITD) e doença celíaca (DC).

rs1805010	DM1	DM1+AITD+CD+	DM1+AITD-CD-	DM1+AITD-CD+	DM1+AITD+CD-
Alelos	n=(%)	n=(%)	n=(%)	n=(%)	n=(%)
A	173 (50,6%)	5 (42%)	125 (50%)	9 (64%)	34 (50%)
G	169 (49,4%)	7 (58%)	123 (50%)	5 (36%)	34 (50%)
Genótipos					
AA	47 (27,5%)	0	37 (30%)	2 (29%)	8 (24%)
AG	79 (46,2%)	5 (83%)	51 (41%)	5 (71%)	18 (53%)
GG	45 (26,3%)	1 (17%)	36 (29%)	0	8 (24%)
rs1805011					
Alelos					
A	264 (77,2%)	8 (67%)	194 (78%)	9 (64%)	53 (78%)
C	78 (22,8%)	4 (33%)	54 (22%)	5 (36%)	15 (22%)
Genótipos					
AA	103 (60,2%)	3 (50%)	76 (61%)	3 (43%)	21 (62%)
AC	58 (34%)	2 (33%)	42 (34%)	3 (43%)	11 (32%)
CC	10 (5,8%)	1 (17%)	6 (5%)	1 (14%)	2 (6%)
rs1805013					
Alelos					
C	334 (97,6%)	12 (100%)	242 (98%)	13 (93%)	67 (99%)
T	8 (3,4%)	0	6 (2%)	1 (7%)	1 (1%)
Genótipos					
CC	163 (95,3%)	6 (100%)	118 (95%)	6 (86%)	33 (97%)
CT	8 (4,7%)	0	6 (5%)	1 (14%)	1 (3%)
TT	0	0	0	0	0
rs1805015					
Alelos					
C	62 (18%)	2 (17%)	47 (19%)	5 (36%)	8 (12%)
T	276 (82%)	10 (83%)	197 (81%)	9 (64%)	60 (88%)
Genótipos					
CC	5 (3%)	0	3 (4%)	2 (29%)	0
CT	52 (31%)	2 (33%)	41 (34%)	1 (14%)	8 (24%)
TT	112 (66%)	4 (67%)	78 (64%)	4 (57%)	26 (76%)
rs1805016					
Alelos					
G	38 (11%)	2 (17%)	21 (8%)	2 (14%)	13 (19%)
T	304 (89%)	10 (83%)	227 (92%)	12 (86%)	55 (81%)
Genótipos					
GG	3 (2%)	0	1 (1%)	0	2 (6%)
GT	32 (18%)	2 (33%)	19 (15%)	2 (29%)	9 (26%)
TT	136 (80%)	4 (67%)	104 (85%)	5 (71%)	23 (68%)
rs1801275					
Alelos					
A	230 (67,2%)	8 (67%)	171 (69%)	7 (50%)	44 (65%)
G	112 (32,8%)	4 (33%)	77 (31%)	7 (50%)	24 (35%)
Genótipos					
AA	79 (46%)	3 (50%)	59 (48%)	2 (29%)	15 (44%)
AG	72 (42%)	2 (33%)	53 (43%)	3 (43%)	14 (41%)
GG	20 (12%)	1 (17%)	12 (10%)	2 (29%)	5 (15%)

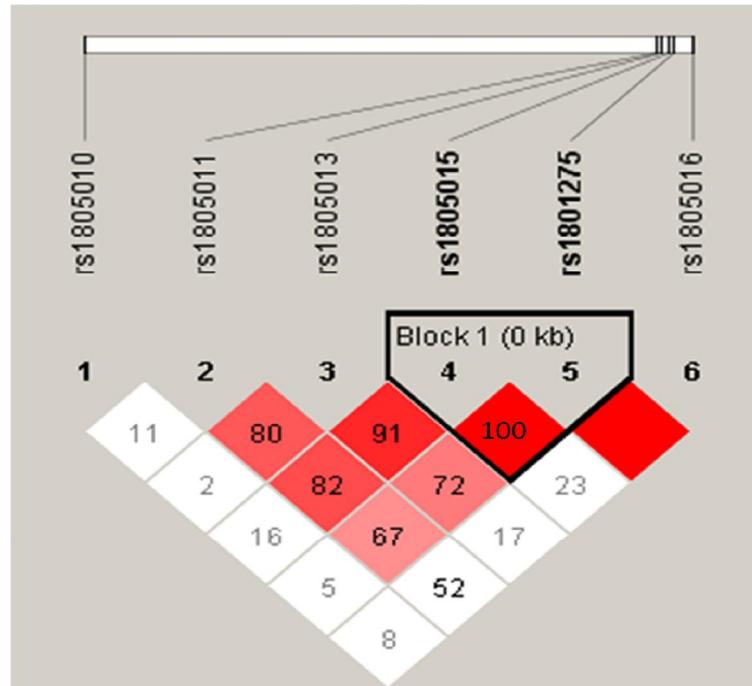
Tabela 9. *p*-value obtido por meio do teste exato de Fisher comparando as frequências alélicas e genóticas de polimorfismos do *IL4R* entre grupos estratificados e os controles.

SNPs	AITD+ DC+ vs controles		AITD- DC- vs controles		AITD- DC+ vs controles		AITD+ DC- vs controles	
	p value	OR (IC 95%)	p value	OR (IC 95%)	p value	OR (IC 95%)	p value	OR (IC 95%)
rs1805010								
Alelos								
A		Ref		ref		Ref		Ref
G	0,562	1,54 (0,41-6,29)	0,62	1,08 (0,77-1,52)	0,42	0,61 (0,15-2,08)	0,79	1,10 (0,63-1,91)
Genótipos								
AA	0,158	0 (0-1,88)	0,577	1,19 (0,66-2,14)	1	0,66 (0,06-4,23)	0,657	0,73 (0,25-1,93)
AG		Ref		ref		Ref		Ref
GG	0,663	0,40 (0-3,75)	0,251	1,40 (0,77-2,57)	0,175	0 (0-2,28)	1	0,88 (0,30-2,36)
rs1805011								
Alelos								
A		Ref		ref		Ref		Ref
C	0,48	1,73 (0,37-6,66)	0,921	0,96 (0,63-1,45)	0,326	1,92 (0,49-6,60)	0,354	1,21 (0,79-1,84)
Genótipos								
AA		Ref		ref		Ref		Ref
AC	1	1,25 (0,10-11,2)	0,9	1,03 (0,61-1,74)	0,426	1,87(0,24-14,4)	1	0,98 (0,4-2,31)
CC	0,333	3,31 (0,05-45,5)	0,798	0,79 (0,23-2,47)	0,333	3,31 (0,05-45,5)	1	0,96 (0,09-4,90)
rs1805013								
Alelos								
C		Ref		ref		Ref		Ref
T	1	0 (0-8,61)	0,269	0,53 (0,16-1,46)	0,482	1,66 (0,03-12,4)	0,493	0,32 (0-2,15)
Genótipos								
CC		Ref		ref		Ref		Ref
CT	1	0 (0-9,55)	0,259	0,52 (0,16-1,46)	0,49	1,71 (0,03-15,5)	0,484	0,31 (0-2,16)
CC	1	0 (0-inf)	1	0 (0-inf)	1	0 (0-inf)	1	0 (0-inf)
rs1805015								
Alelos								
C	1	0,84 (0,08-4,12)	1	1,01 (0,65-1,55)	0,162	2,35 (0,59-8,11)	0,17	(0,56 (0,22-1,26)
T		Ref		ref		Ref		Ref
Genótipos								
TT	1	0 (0-18,77)	0,259	0,43 (0,07-1,70)	0,096	5,46 (0,44-43,49)	0,213	0 (0-2,03)
CT	0,671	1,30(0,11-9,46)	0,243	1,37 (0,80-2,35)	1	0,65 (0,01-6,85)	0,678	0,80 (0,29-1,99)
CC		Ref		ref		Ref		Ref
rs1805016								
Alelos								
G	0,64	1,52 (0,15-1,50)	0,225	0,70 (0,38-1,25)	0,672	1,26 (0,13-6)	0,111	1,79 (0,83-3,68)
T		Ref		ref		Ref		Ref
Genótipos								
GG	1	0 (0-inf)	0,43	Inf (0,03-inf)	1	0 (0-inf)	0,02	Inf (1,06-inf)
GT	0,627	1,64 (0,14-11,9)	0,109	0,60 (0,31-1,13)	0,666	1,32 (0,12-8,43)	0,653	1,29 (0,48-3,18)
TT		Ref		ref		Ref		Ref
rs1801275								
Alelos								
A		Ref		Ref		Ref		Ref
G	1	0,94 (0,20-3,62)	0,382	0,85 (0,59-1,22)	0,26	1,89 (0,55-6,47)	0,89	1,03 (0,57-1,83)
Genótipos								
AA		Ref		Ref		Ref		Ref
AG	1	0,66 (0,05-5,99)	0,711	0,89 (0,53-1,50)	1	1,49 (0,16-18,3)	1	0,93 (0,38-2,22)
GG	1	1,14 (0,02-15,03)	0,443	0,70 (0,29-1,60)	0,235	3,38 (0,23-49,08)	0,777	1,14 (0,29-3,18)

- Haplótipos

Foram utilizados os programas SNPstats e Haploview na construção dos haplótipos, e sendo assim foram encontrados 13 haplótipos (tabela 10). Todos os haplótipos apresentaram frequências semelhantes entre pacientes e controles. Apenas os haplótipos I e II são mais frequentes nas duas populações (Pacientes=0,34 e 0,24; controles=0,34 e 0,28, respectivamente). Os outros 11 haplótipos são mais raros na população estudada. O SNP rs1801275 está em forte desequilíbrio de ligação com o rs1805015 ($D' \approx 1,00$), assim como, com o rs1805016 ($D' \approx 1,00$). Os SNPs rs1805013 e rs1805015 apresentaram um $D' \approx 0,91$, enquanto que os SNPs rs1805011, rs1805013 e 1805015 apresentaram um $D' \approx 0,82$ (Figura 12). O haplótipo III (G/ C/ C/ C/ T/ G) está diferentemente distribuído quando comparados os pacientes e os controles ($p=0,0085$) (tabela 11).

Figura 12. Mapa do desequilíbrio de ligação dos seis polimorfismos do IL4R estudados. O mapa foi feito através do software Haploview 4.2. Os valores D' (%) são mostrados nos quadros ($D'=100\%$ para as caixas vazias)



FONTE: A autora

Tabela 10. Frequências haplótípicas de polimorfismos do gene IL4R em comparação entre os grupos de estudos.

Haplótipos	rs1805010	rs1805011	rs1805013	rs1805015	rs1805016	rs1801275	DM1	Controles	OR (95% IC)	P-value
I	A	A	C	T	T	A	0,34	0,34	ref	ref
II	G	A	C	T	T	A	0,24	0,28	1,25 (0,79 - 1,96)	0,34
III	G	C	C	C	T	G	0,03	0,05	3,25 (1,36 - 7,79)	0,0085
IV	A	C	C	C	T	G	0,04	0,05	1,05 (0,47 - 2,35)	0,9
V	A	A	C	T	T	G	0,04	0,03	0,93 (0,36 - 2,44)	0,89
VI	A	C	C	T	G	G	0,02	0,02	1,13 (0,29 - 4,36)	0,86
VII	G	C	C	T	G	G	0,01	0,02	0,00 (Inf - Inf)	1
VII	G	A	C	C	T	A	0,04	0,02	0,00 (Inf - Inf)	1
IX	G	C	C	T	T	G	0,05	0,02	1,99 (0,35 - 11,14)	0,44
X	G	A	C	T	T	G	0,02	0,02	0,70 (0,18 - 2,71)	0,61
XI	A	C	C	T	T	G	0,02	0,02	0,31 (0,07 - 1,37)	0,12
XII	G	A	T	C	G	G	0,01	0,01	0,77 (0,18 - 3,34)	0,73
XIII	G	C	C	C	G	G	0,02	0,01	0,48 (0,10 - 2,34)	0,37

6 Discussão

6.1 Polimorfismo indel 14pb *HLA-G*

O HLA-G exerce importantes funções tolerogênicas. Muitos estudos têm evidenciado um papel imunorregulador mais vasto dessa molécula, e, ao longo dos últimos anos, alguns pesquisadores têm elucidado a função do HLA-G, demonstrando a inibição tanto de células NK, como a citólise mediada por células T, que pode ser um ponto crucial para a compreensão do papel dessa molécula na patogênese do DM1. Apesar disso, os estudos de associação com o indel 14 pb e doenças autoimunes imunocomplexas mostram resultados contraditórios que pode ser devido ao que é chamado de paradoxo do HLA-G.

O presente trabalho é o primeiro investigando a associação do indel 14 pb do HLA-G com indivíduos portadores do Diabetes mellitus tipo 1. Os resultados mostraram um aumento significativo nos controles (12%) na frequência de homozigotos I/I, em comparação com os pacientes (5%), associando com uma menor suscetibilidade ao desenvolvimento do DM1 (OR=0,39; p=0,028).

Na literatura são encontrados alguns trabalhos de associação do indel com doenças autoimunes, como na doença celíaca (FABRIS et al., 2011) e lúpus eritematoso sistêmico (RIZZO et al., 2008; VEIT et al., 2009), que envolvem uma variedade de fatores, principalmente, imunológicos e genéticos, em seu desenvolvimento, assim como no diabetes mellitus tipo 1. Como já referido, não há estudos de associação envolvendo DM1 e o indel 14 pb do HLA-G, mas Cirulli et al realizaram um estudo de expressão e demonstraram que o HLA-G é um determinante no repertório HLA nas ilhotas pancreáticas, fornecendo evidências da apresentação de antígenos na superfície de células endócrinas, em resposta ao crescimento, estímulos inflamatórios e secretores.

O autor relatou que o HLA-G é constitutivamente expresso em baixos níveis intracelulares em células endócrinas pancreáticas e uma retenção dessa molécula a partir da reciclagem do HLA-G pelo complexo de Golgi, para o retículo endoplasmático, ocasiona num significativo prolongamento do tempo de vida intracelular do HLA-G permitindo, assim, a interação com peptídeos de baixa afinidade, que podem atuar como autoantígenos (FAIRCHILD ;WRAITH, 1996).

Dessa forma, essa interação pode contribuir na tolerância imunológica da ilhota, por funcionar como um sistema tampão, impedindo a apresentação à superfície de autoantígenos não susceptíveis de ter provocado deleção clonal.

Um estudo realizado em pacientes com Doença celíaca, em uma população italiana, mostrou que o alelo da inserção (I) e o genótipo homozigoto I/I do indel 14 pb são mais frequentes em pacientes com doença Celíaca (49 vs. 42 %; 25 vs.15%, respectivamente) quando comparados com controles e, estão significativamente associados com o aumento ao risco da doença (OR 1.35; $P < 0.001$) (FABRIS et al., 2011). Em nossos resultados não observamos diferenças significantes nas frequências alélicas e genótípicas dos pacientes DM1 portadores de doença celíaca (DM1+AITD-CD+). Consideramos que após a estratificação o tamanho amostral dos grupos foi pequeno para alguma significância estatística.

Em relação a outras doenças autoimunes imunocomplexas, mas não associadas ao diabetes mellitus o tipo 1, o Lupus eritematoso sistêmico tem sido alvo de estudos com o indel 14pb. Veit e cols. (VEIT et al., 2009) estudando a população do Rio Grande do Sul (região Sul do Brasil) observou que o alelo inserção não é um fator de risco para o LES. Rizzo et al. (2008) analisaram o mesmo polimorfismo em uma população italiana e encontraram uma maior frequência do alelo inserção, associando com o desenvolvimento do LES e observou uma maior frequência de deleção, tanto nos pacientes como nos controles. Wu e cols. (WU et al., 2009) não encontraram associação das frequências alélicas ou genótípicas com o desenvolvimento do LES em uma população chinesa, no entanto, quando foram avaliados os níveis séricos de HLA-G solúvel nos pacientes, foi observado um aumento nas concentrações dessa proteína, indicando que a expressão de HLA-G no LES pode fazer parte do mecanismo na tentativa de restaurar o processo de autotolerância e conter a inflamação.

Por representar uma molécula imunomoduladora, oHLA-G desempenha um papel no mecanismo de imunotolerância pela inibição da atividade das células NK, linfócitos T citotóxicos e de células apresentadoras de antígenos e sua expressão é aumentada em condições patológicas (ABEDIANKENAR et al., 2007). Já foi demonstrado que o padrão nos níveis de expressão encontrados nas ilhotas pancreáticas é baixo (CIRULLI et al., 2006), mas suficiente para contribuir na imunotolerância nas ilhotas pancreáticas. Em nossos resultados foi encontrado nos controles uma maior frequência do genótipo da inserção, relacionado com baixa

expressão da molécula, possivelmente a presença da molécula mesmo em baixos níveis podem impedir a apresentação de autoantígenos à superfície das células endócrinas, evitando o ataque as mesmas e, conseqüentemente, diminuindo a suscetibilidade ao desenvolvimento do DM1.

6.2 Polimorfismos do gene *IL4R*

O *IL4R* é descrito como um gene que codifica o receptor da interleucina4, molécula que funciona no balanço de Th1/Th2, sendo responsável pela diferenciação do Th2 na resposta imune. Alguns estudos reportam que SNPs não sinônimos são responsáveis pela alteração da atividade biológica da molécula.

Neste estudo investigamos a associação de polimorfismos do gene *IL4R* em pacientes DM1 e controles na população do estado de Pernambuco, Nordeste brasileiro. Em nossos resultados não encontramos associação dos SNPs do *IL4R* quando comparamos os controles e pacientes DM1. Mas analisando os haplótipos, observamos que o haplótipo III (GCCCTG) foi associado à maior suscetibilidade ao DM1 ($p=0,008$; $OR=3,25$).

Um estudo realizado nas Filipinas com 90 pacientes portadores do Diabetes tipo 1 e polimorfismos do *IL4R* (rs1805010, rs1805011, rs1505015 e rs1801275) encontrou na população uma frequência significativamente menor ($p=0,02$) do alelo C (11,7%) do SNP rs1805011. O que não foi observado em nossos resultados já que esse mesmo alelo apresentou frequências semelhantes nos dois grupos (DM1:23% ; Controles:22%). Quanto aos haplótipos, os autores mostraram que os SNPs rs1805011, rs1805015 e rs1801275 estavam em forte desequilíbrio de ligação e uma tendência à proteção (BUGAWAN et al., 2003). Mirel et al., 2002 em uma investigação dos mesmos haplótipos numa população caucasiana observou resultados semelhantes aos de Bugawan.

Em nossos achados o efeito combinado dos seis SNPs compondo os haplótipos, conferiram para o haplótipo III, um risco aumentado de desenvolver DM1. A presença dos alelos variantes dos SNPs rs1805015 e rs1801275, pode influenciar na regulação das respostas Th1 e Th2, neste caso em direção ao Th1, perfil

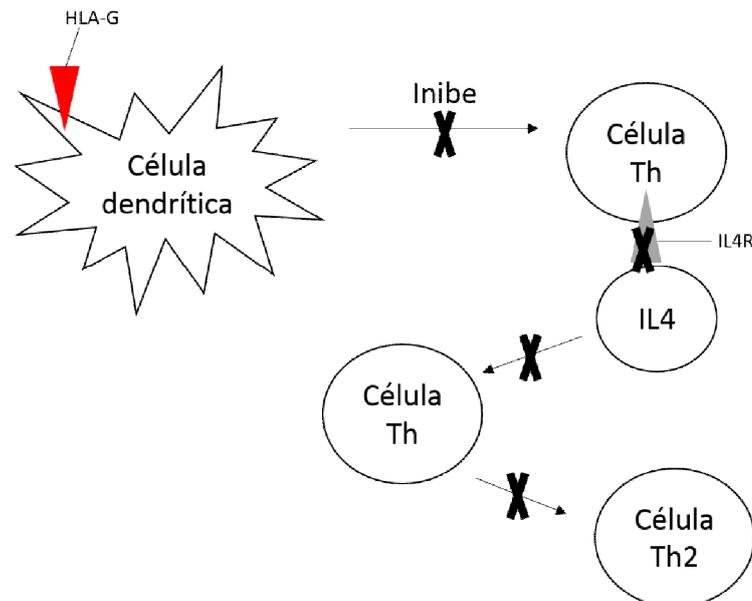
presente na patogênese do DM1, refletindo em nossos resultados uma maior suscetibilidade ao DM1.

MAIER et al., 2003 também analisaram os SNPs rs1805011, rs1805015 e rs1801275 em uma população Europeia, com casos de DM1, e, assim como em nosso estudo também não encontraram associação para os três polimorfismos. QUet al, 2006 avaliaram seis polimorfismos do gene *IL4R*, entre eles o rs1805010, rs1805011, rs1805013, rs1805015 e rs1801275 (estudados na população Pernambucana) em 830 famílias Europeias e nenhuma associação foi encontrada. Observamos que as frequências dos alelos menos frequentes dos três polimorfismos foram semelhantes às frequências encontradas nos pacientes em nosso estudo (rs1805010: 44% vs 49%; rs1805013: 4% vs 2%, rs1805015 16% vs 19%, respectivamente). Em ambos os casos, os autores consideram que a heterogeneidade dentro das populações seja um ponto forte para distribuição alélica e a falta de associação. .

6.3 HLA-G e IL4R na genética e patogênese do DM1

Estudos com DM1 identificaram um papel importante das células dendríticas e células T no processo imunopatogênico. Sabe-se que essas células induzem a resposta imune fornecendo sinais para que os linfócitos T sejam ativados. Nessa ação, as células dendríticas podem transportar moléculas HLA-G, que possui como uma de suas funções, a inibição da atividade das células T. Como já foi descrito anteriormente neste trabalho, a interleucina4 é secretada pelos linfócitos Th e quando liga-se, por autoafinidade, ao IL4R, promove a diferenciação das T helper em Th2. Dessa forma, é possível que a presença do HLA-G possa alterar os receptores dos linfócitos que não irão reconhecer os antígenos e, por consequência, não será secretada a interleucina4 (figura 13).

Figura 13. Esquema demonstrando a atuação do HLA-G inibindo a diferenciação das células Th.



FONTE: A autora

Como no desenvolvimento do DM1 o perfil de secreção é Th1, e este não será suprimido pela diferenciação do Th2, possivelmente, a infiltração dos linfócitos nas ilhotas pancreáticas pode ocorrer iniciando o processo inflamatório (QU et al., 2006; ABEDIANKENARI et al., 2007; PEAKMAN, 2013), mas o contexto com o HLA-G inibindo a atividade autorreativa do Th1, é possível que o ataque às células das ilhotas pancreáticas seja suprimido, impedindo o desenvolvimento do DM1. Isto pode ser evidenciado em nossos resultados que indicaram que a baixa expressão do HLA-G em células pancreáticas diminuem as chances de desenvolvimento da doença.

Apesar disso, temos que destacar que esses não são os únicos fatores atrelados ao desenvolvimento do DM1, já que esta é uma doença complexa, e uma grande variedade de moléculas e células estão envolvidas. Contudo, estudar o papel, tanto do HLA-G como do IL4R, no DM1 contribui nos possíveis mecanismos responsáveis no escape da tolerância imunológica envolvida na autoimunidade nas ilhotas pancreáticas.

7 Conclusão

O Estudo de associação com o Diabete mellitus tipo 1 e o indel 14 pb do *HLA-G* foi o primeiro realizado mundialmente e com os polimorfismos do *IL4R* o primeiro na população Brasileira. Pouco ainda se sabe sobre o envolvimento do indel 14pb com o DM1, mas, em nosso trabalho, foi possível inferir uma associação de menor suscetibilidade, inéditos em populações mundiais.

1. A inserção do indel 14 pb está associada com uma menor suscetibilidade ao DM1 ($p=0,028$; $OR=0,39$; $IC95\%= 0,16-0,92$);
2. Através do modelo recessivo, foi evidenciada a associação da correlação da idade do diagnósticos e o genótipo I/I ($p=0,029$);
3. Não foi evidenciada associação entre as frequências alélicas e genotípicas, entre os grupos dos pacientes e os controles, para os SNPs estudados no *IL4R*;
4. O Haplótipo III, dos SNPs analisados do *IL4R* (G/C/C/C/T/G), foi associado ao risco do DM1 ($p=0,008$; $OR=3,25$), devido a presença dos alelos variantes dos SNPs não-sinônimos, rs1805015 e rs1801275, que influenciam no balanço Th1/Th2.

Referências Bibliográficas

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008
- ABIRU, N.; KAWASAKI, E.; EGUCH, K. Current knowledge of Japanese type 1 diabetic syndrome. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 18, n. 5, p. 357. 66, 2002.
- ADAMS, E. J.; LUOMA, A. M. **The adaptable major histocompatibility complex (MHC) fold: structure and function of nonclassical and MHC class I-like molecules**. [s.l: s.n.]. v. 31p. 529. 61
- AL-MASKARI, A. Y.; AL-MASKARI, M. Y.; AL-SUDAIRY, S. Oral Manifestations and Complications of Diabetes Mellitus: A review. **Sultan Qaboos University medical journal**, v. 11, n. 2, p. 179. 86, maio 2011.
- ALY, T. A et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 38, p. 14074. 9, 19 set. 2006.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 35 Suppl 1, p. S64. 71, jan. 2012.
- ARIF, S. et al. Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. v. 113, n. 3, p. 451. 463, 2004.
- ATKINSON, M. A; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 6736, n. 13, p. 1. 14, 25 jul. 2013.
- BALDA, C. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. v. 45, n. 2, p. 175. 180, 1999.

BARRATT, B. J. et al. Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 7, p. 1884. 9, jul. 2004.

BLOMHOFF, A et al. Linkage disequilibrium and haplotype blocks in the MHC vary in an HLA haplotype specific manner assessed mainly by DRB1*03 and DRB1*04 haplotypes. **Genes and immunity**, v. 7, n. 2, p. 130. 40, mar. 2006.

BORCHERS, A. T.; UIBO, R.; GERSHWIN, M. E. The geoepidemiology of type 1 diabetes. **Autoimmunity reviews**, v. 9, n. 5, p. A355. 65, mar. 2010.

BOTTINI, N. et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. **Nature genetics**, v. 36, n. 4, p. 337. 8, abr. 2004.

BUGAWAN, T. L. et al. Association and interaction of the IL4R, IL4, and IL13 loci with type 1 diabetes among Filipinos. **American journal of human genetics**, v. 72, n. 6, p. 1505. 14, jun. 2003.

BURKE, G. W.; CIANCIO, G.; SOLLINGER, H. W. Advances in pancreas transplantation. **Transplantation**, v. 77, n. 9 Suppl, p. S62. 7, maio 2004.

campos 1998.pdf, [s.d.].

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. **Human immunology**, v. 69, n. 11, p. 700. 7, nov. 2008a.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. **Human Immunology**, v. 69, n. 11, p. 700. 707, nov. 2008b.

CAROSELLA, E. D. The tolerogenic molecule HLA-G. **Immunology letters**, v. 138, n. 1, p. 22. 4, jul. 2011.

CASTELLI, E. C. et al. The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes and immunity**, v. 11, n. 2, p. 134. 41, mar. 2010.

CHEN, X.-Y. et al. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. **Tissue antigens**, v. 72, n. 4, p. 335. 41, out. 2008.

CIRULLI, V. et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1214. 22, 1 maio 2006a.

CIRULLI, V. et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1214. 1222, 1 maio 2006b.

COPPIETERS, K. T. et al. Immunology in the clinic review series: focus on type 1 diabetes and viruses: the role of viruses in type 1 diabetes: a difficult dilemma. **Clinical and experimental immunology**, v. 168, n. 1, p. 5. 11, abr. 2012.

COPPIETERS, K. T.; WIBERG, A.; VON HERRATH, M. G. Viral infections and molecular mimicry in type 1 diabetes. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 120, n. 12, p. 941. 9, dez. 2012.

DIAMOND, T.; GROUP, P. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 23, n. 8, p. 857. 66, ago. 2006.

DOMÍNGUEZ-BENDALA, J. et al. Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 1, p. 59. 63, jan. 2012.

EGIDI, F. M. Management of hyperglycaemia after pancreas transplantation: are new immunosuppressants the answer? **Drugs**, v. 65, n. 2, p. 153. 66, jan. 2005.

EHEHALT, S. et al. Prediction model for the incidence and prevalence of type 1 diabetes in childhood and adolescence: evidence for a cohort-dependent increase within the next two decades in Germany. **Pediatric diabetes**, v. 13, n. 1, p. 15. 20, fev. 2012.

EIKE, M. C. et al. Conditional analyses on the T1DGC MHC dataset: novel associations with type 1 diabetes around HLA-G and confirmation of HLA-B. **Genes and immunity**, v. 10, n. 1, p. 56. 67, jan. 2009a.

EIKE, M. C. et al. Conditional analyses on the T1DGC MHC dataset: novel associations with type 1 diabetes around HLA-G and confirmation of HLA-B. **Genes and Immunity**, v. 10, n. 1, p. 56. 67, jan. 2009b.

EN, A. B.; PAULISTA, E.; FEDERAL, U. Marcadores Genéticos e Auto-Imunes do Diabetes Mellito Tipo 1: da Teoria para a Prática. p. 166. 180, 2008.

ERINGSMARK REGNÉLL, S.; LERNMARK, A. The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 30, n. 2, p. 155. 60, fev. 2013.

ERLICH, H. et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 1084. 92, abr. 2008.

FABRIS, A. et al. HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism in celiac disease. **The American journal of gastroenterology**, v. 106, n. 1, p. 139. 44, jan. 2011.

FIFE, B. T. et al. Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface . linked CTLA-4 agonist. v. 116, n. 8, 2006.

FILIPPI, C. M.; VON HERRATH, M. G. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. **Diabetes**, v. 57, n. 11, p. 2863. 71, nov. 2008.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 175, n. 2, p. 165. 70, 18 jul. 2006.

HARJUTSALO, V. et al. Incidence of type 1 diabetes in Finland. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 4, p. 427. 8, 24 jul. 2013.

HVIID, T. V. F. et al. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**, v. 55, n. 2, p. 63. 79, maio 2003.

IVANSSON, E. L. et al. Variants of chemokine receptor 2 and interleukin 4 receptor, but not interleukin 10 or Fas ligand, increase risk of cervical cancer. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 121, n. 11, p. 2451. 7, 1 dez. 2007.

JAHROMI, M. M.; EISENBARTH, G. S. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 64, n. 7-8, p. 865. 72, abr. 2007.

JEKER, L. T.; BOUR-JORDAN, H.; BLUESTONE, J. A. Breakdown in peripheral tolerance in type 1 diabetes in mice and humans. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 3, p. a007807, mar. 2012.

KAHN, H. S. et al. Association of type 1 diabetes with month of birth among U.S. youth: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Diabetes care**, v. 32, n. 11, p. 2010. 5, nov. 2009.

KARJALAINEN, J. et al. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England journal of medicine**, v. 327, n. 5, p. 302. 7, 30 jul. 1992.

KEYMEULEN, B. et al. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. **The New England journal of medicine**, v. 352, n. 25, p. 2598. 608, jun. 2005.

KEYMEULEN, B. et al. Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. **Diabetologia**, v. 53, n. 4, p. 614. 23, abr. 2010.

KIM, H. S.; LEE, M.-S. Role of innate immunity in triggering and tuning of autoimmune diabetes. **Current molecular medicine**, v. 9, n. 1, p. 30. 44, fev. 2009a.

- KIM, H. S.; LEE, M.-S. Role of innate immunity in triggering and tuning of autoimmune diabetes. **Current molecular medicine**, v. 9, n. 1, p. 30. 44, fev. 2009b.
- KNIP, M. et al. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, n. 11, p. S125. 36, dez. 2005.
- KYVIK, K. O.; GREEN, A; BECK-NIELSEN, H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 311, n. 7010, p. 913. 7, 7 out. 1995.
- LEMPAINEN, J.; ILONEN, J. Influence of type 1 diabetes genes on disease progression: similarities and differences between countries. **Current diabetes reports**, v. 12, n. 5, p. 447. 55, out. 2012.
- LISBÔA, H. R. et al. Incidence of type 1 diabetes mellitus in Passo Fundo, RS, Brazil. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 31, n. 12, p. 1553. 6, dez. 1998.
- LITTORIN, B. et al. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). **Diabetologia**, v. 49, n. 12, p. 2847. 52, dez. 2006.
- MAIER, L. M. et al. Testing the possible negative association of type 1 diabetes and atopic disease by analysis of the interleukin 4 receptor gene. **Genes and immunity**, v. 4, n. 7, p. 469. 75, out. 2003.
- MAIER, L. M. et al. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. **PLoS genetics**, v. 5, n. 1, p. e1000322, jan. 2009.
- MALLONE, R.; BREZAR, V.; BOITARD, C. T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives. **Clinical & developmental immunology**, v. 2011, n. Table 1, p. 513210, jan. 2011.

MIREL, D. B. et al. Association of IL4R haplotypes with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 11, p. 3336. 41, nov. 2002.

MOLTCHANOVA, E. V et al. Seasonal variation of diagnosis of Type 1 diabetes mellitus in children worldwide. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 26, n. 7, p. 673. 8, jul. 2009.

NOBLE, J. A; ERLICH, H. A. Genetics of type 1 diabetes. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 1, p. a007732, jan. 2012.

NOBLE, J. A; VALDES, A. M. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. **Current diabetes reports**, v. 11, n. 6, p. 533. 42, dez. 2011.

NOKOFF, N.; REWERS, M. Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1281, p. 1. 15, abr. 2013.

PARK, K. S. et al. Increased risk of human leukocyte antigen-G gene variants in Behçet's disease. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 24, n. 5 Suppl 42, p. S126. 7, [s.d.].

PEAKMAN, M. Immunological pathways to β -cell damage in Type 1 diabetes. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 30, n. 2, p. 147. 54, fev. 2013.

PISTOIA, V. et al. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? **Seminars in cancer biology**, v. 17, n. 6, p. 469. 79, dez. 2007.

POCIOT, F. et al. Genetics of type 1 diabetes: what's next? **Diabetes**, v. 59, n. 7, p. 1561. 71, jul. 2010.

PROTS, I. et al. Association of the IL4R single-nucleotide polymorphism I50V with rapidly erosive rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 54, n. 5, p. 1491. 500, maio 2006.

QU, H. Q. et al. Lack of association of type 1 diabetes with the IL4R gene. **Diabetologia**, v. 49, n. 5, p. 958. 61, maio 2006.

QUEIROZ, M. S. [Type 1 diabetes and autoimmune polyendocrine syndromes]. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 52, n. 2, p. 198. 204, mar. 2008.

RAZA, K. et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. **Arthritis research & therapy**, v. 7, n. 4, p. R784. 95, jan. 2005.

RITEAU, B. et al. HLA-G2, -G3, and -G4 isoforms expressed as nonmature cell surface glycoproteins inhibit NK and antigen-specific CTL cytotoxicity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 8, p. 5018. 26, 15 abr. 2001.

RIZZO, R. et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. **Tissue antigens**, v. 71, n. 6, p. 520. 9, jun. 2008.

ROUSSEAU, P. et al. The 14 bp Deletion-Insertion polymorphism in the 3' UTR region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Human Immunology**, v. 64, n. 11, p. 1005. 1010, nov. 2003.

RYAN, E. A. et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2060. 9, jul. 2005.

SAVAGE, E. et al. The science of intervention development for type 1 diabetes in childhood: systematic review. **Journal of advanced nursing**, v. 66, n. 12, p. 2604. 19, dez. 2010.

SKYLER, J. S. et al. Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. **Diabetes care**, v. 28, n. 5, p. 1068. 76, maio 2005.

STECK, A. K. et al. **Brief Genetics Report**. 2005.

STEPHENSON, L. et al. An IL-4R alpha allelic variant, I50, acts as a gain-of-function variant relative to V50 for Stat6, but not Th2 differentiation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 7, p. 4523. 8, 1 out. 2004.

TAN, Z. et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. **American journal of human genetics**, v. 81, n. 4, p. 829. 34, out. 2007.

THUNANDER, M. et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden. **Diabetes research and clinical practice**, v. 82, n. 2, p. 247. 55, nov. 2008.

TODD, J. A. Etiology of type 1 diabetes. **Immunity**, v. 32, n. 4, p. 457. 67, 23 abr. 2010.

VAARALA, O. The gut immune system and type 1 diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 958, p. 39. 46, abr. 2002.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiological reviews**, v. 91, n. 1, p. 79. 118, jan. 2011.

VAN BELZEN, M. J. et al. CTLA4 +49 A/G and CT60 polymorphisms in Dutch coeliac disease patients. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 12, n. 9, p. 782. 5, set. 2004.

VAN DEN DRIESSCHE, A et al. Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. **The Netherlands journal of medicine**, v. 67, n. 11, p. 376. 87, dez. 2009.

VEIT, T. D. et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 18, n. 5, p. 424. 30, abr. 2009.

VEIT, T. D.; CHIES, J. A B. Tolerance versus immune response -- microRNAs as important elements in the regulation of the HLA-G gene expression. **Transplant immunology**, v. 20, n. 4, p. 229. 31, mar. 2009.

VEIT, T. D.; VIANNA, P.; CHIES, J. A. B. HLA-G - From Fetal Tolerance to a Regulatory Molecule in Inflammatory Diseases. p. 1. 15, 2010.

VIRTANEN, S. M. et al. Cow Milk Consumption, HLA-DQB1 Genotype, and Type 1 Diabetes: A Nested Case-Control Study of Siblings of Children With Diabetes. **Diabetes**, v. 49, n. April 1989, 2000.

YOON, J.-W.; JUN, H.-S. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. **American journal of therapeutics**, v. 12, n. 6, p. 580-91, 2005.

Anexos

Artigo publicado

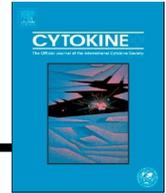
Interleukin 18 (IL18) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

Cytokine

journal homepage: www.journals.elsevier.com/cytokine



Interleukin 18 (IL18) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients

Nathália A.C. Tavares^a, Manuella M.S. Santos^{a,c}, Ronald Moura^{a,c}, Jacqueline Araújo^b, Rafael Guimarães^{a,c}, Sergio Crovella^{a,c}, Lucas Brandão^{a,d,1}

^aKeizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil ^bPediatric Endocrinology Unity of Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil ^cDepartment of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^dDepartment of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

article info

Article history:

Received 10 September 2012

Received in revised form 8 March 2013

Accepted 10 March 2013

Available online 2 April 2013

Keywords:

IL18

Type 1 diabetes

Autoimmune thyroiditis

Celiac disease

Association study

abstract

Interleukin 18 (IL-18) is a cytokine that plays an important role in the Th1 response, by its ability to induce IFN- γ production in T cells and natural killer cells. Functional variants of IL18 gene has been reported as associated with type 1 diabetes (T1D). In the present study were analyzed three promoter single nucleotide polymorphisms (SNPs), at -656 (rs1946519), -607 (rs1946518) and -137 (rs187238) position, in 181 children and adolescents with T1D and 122 healthy individuals, both from metropolitan area of Recife, Northeast of Brazil. T1D patients were stratified according to the presence autoimmune thyroiditis and celiac disease. Allele and genotype frequencies of IL18 SNPs were Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls. The allele -137G and the haplotype -656G/-607C/-137G were more frequent in T1D patients (OR = 1.82 and 1.97, respectively) than in healthy controls. However, those SNPs were not associated with the age of T1D onset as well as with the insurgence of AITD and/or CD in concomitant with T1D patients. Our findings suggest an association between IL18 promoter SNPs and susceptibility to T1D in Brazilian patients.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is a complex multifactorial disorder where pancreatic insulin producer beta cells are immunologically destroyed through a genetic and environmental interplay [1]. Moreover, during the chronic disease evolution of T1D, some patients could develop other organ-specific autoimmune events including the insurgence of autoimmune thyroiditis (AITD) and/or celiac disease (CD) [264], suggesting a shared pathogenesis pathway for these disorders.

The inflammatory pathway has an important role in the development and complications of T1D [5]. In inflammatory events, several interleukins (ILs) could be produced in order to activate specific immune components and present itself as a potential factor in association to T1D pathogenesis [668].

The pro-inflammatory interleukin 18 (IL-18) is directly involved in the innate and specific immune response, due to its ability to activate monocytes, macrophages, natural killer (NK) and in synergy with IL-12, to promote Th1 type response [8,9].

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located at promoter position -607 (dbSNP: rs1946518) and -137 (dbSNP: rs187238) of IL18 gene (11q22.26q23.3), involved in the decrease of IL18 expression [10612], have been studied and associated with the development of T1D [11613]. However, divergent results of association have been found in different populations, being necessary replications studies in population with different genetic background.

The aim of this work is to investigate the association between IL18 promoter polymorphisms, namely-656 (dbSNP: rs1946519), -607 (rs1946518) and -137 (rs187238), and T1D in a population from Northeast of Brazil. This genetic association was never performed in an admixture population, such the Brazilian one, additionally, we hypothesize that patient carrying the IL18 SNPs possess a lower risk to the insurgence of AITD and/or CD in concomitance with T1D, since low levels of IL-18 could diminish the Th1 response and the production of INF- γ .

2. Materials and methods

2.1. Patients

T1D patients (n = 181) were enrolled and followed up at the three major pediatric endocrinology centers of health public

[†] Corresponding author. Address: Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, 50670-901. Recife, Pernambuco, Brazil. Tel.: +55 8121268484; fax: +55 8121268485.

E-mail address: lucabrand@gmail.com (L. Brandão).

¹ www.ufpe.br/lika.

service from Recife, Brazil (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Hospital da Restauração and Hospital das Clínicas - UFPE). The diagnosis of T1D followed the clinical criteria of American Diabetes Association [14]. The mean age of T1D patients was 13.2 years (SD \pm 4.1), with 101/181 (56%) females, a gender ratio equals to 1.26:1. The average age at the onset of T1D was 7.3 years (SD \pm 3.4) and the mean duration of the disease was 5.9 years (SD \pm 3.8).

2.2. Autoimmune thyroid and celiac disease diagnosis

Antibodies to thyroperoxidase (Anti-TPO) diagnosis were performed by chemio-luminescence (Immulate anti-TPO Ab, Diagnostic products Co., Los Angeles, USA). Patients with positive anti-TPO (titer exceeding 35 IU/ml, accordingly to manufacturer's suggestion) were considered as having AITD.

Anti-transglutaminase antibodies (anti-tTg) were determined by using the ELISA Eu-tTg kit (Eurospital, Trieste, Italy) following manufacturer's instructions. Patients presenting 10 AU (absorbance units) for anti-tTg antibodies were considered positive and subsequently screened for the presence of HLA DQ2 and/or DQ8 HLA haplotypes by using the Eu-DQ kit (Eurospital, Trieste, Italy). After gluten-free diet in all CD patients, the tTG autoantibodies levels declined, remaining under the cutoff value of 7 AU.

The frequency of AITD in the T1D patients (T1D + AITD + DC-) was 20.9% (38/181), the percentage of patients with CD (T1D + AITD-DC+) was 5.5% (10/181), while patients characterized by both AITD and CD (T1D + AITD + DC+) were 3.3% (6/181).

2.3. Healthy subjects

Healthy individuals from the same geographical region of patients group with no clinical evidence or family history of autoimmune diseases were included as control group. We enrolled 142 healthy subjects, mean age 21.4 years (SD \pm 2.4), 93/142 (65%) females, a gender ratio 1.89:1. In the choice of the control population, the presence of any HLA possibly associated with celiac disease, AITD, T1D and a titer exceeding 35 IU/ml for anti-TPO, 10 AU for anti-tTg and 40 nU/ml for anti-IAA were an exclusion criterion.

A free and informed consent from each person responsible for the patient and healthy individuals were obtained. The local ethical committee (IMIP number 1717/2010) approved the study.

2.4. DNA extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega, Madison, MA) according to the standard laboratory protocols.

2.5. SNP genotyping and haplotypes reconstruction

The SNPs -656 C/A (rs1946519), -607 G/T (rs1946518) and -137 G/C (rs187238) located at promoter region of IL18 gene were genotyped using fluorescent allele-specific probes (TaqMan[®], Life) with ABI-7500 Real-Time as platform. Linkage disequilibrium and haplotypes were computed using the Arlequin software (version 3.1) and SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>).

2.6. Statistical analysis

Allele and genotype frequencies of IL18 promoter SNPs were obtained by direct counting. Fisher's exact test was used to correlate SNPs distribution and the increased susceptibility, clinical aspects of T1D and Hardy-Weinberg equilibrium were obtained using the R program (2005; version 2.1.1; <http://www.r-project.org/>).

Kruskal Wallis test was used in the age at diagnoses analyses. The power test analysis was performed through the G*Power (version 3.1). Odds Ratio (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) were also calculated. The p-values < 0.0015 was considered as statistically significant after Bonferroni correction for multiple tests.

3. Results

In this work we analyzed three functional polymorphisms, -656 C/A, -607 G/T and -137 G/C, at promoter region of the IL18 gene in 181 T1D patients and 122 healthy subjects from the metropolitan region of Recife (Brazil). SNPs allele and genotype distribution are listed in Table 1. Genotype and allele SNPs frequencies in the studied groups were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Thirty-three analyses were done and six statistical differences were found. However, after Bonferroni Multiple Test Correction only two associations for the -137 SNP remained statistically significant ($p > 0.0015$). The -137G allele was less frequent in healthy subjects than in T1D + AITD - CD- (OR = 1.82, $p = 0.0015$; 95%CI = 1.2462.69) and when compared with all T1D + patients ($p = 0.0001$; OR = 1.96 95%CI = 1.3762.80). In addition, the -137G/G genotype was also statistically less frequent in healthy individuals than in patients T1D + AITD - CD- ($p = 0.0005$ OR = 4.55 95%CI = 1.77612.9) and in T1D+ ($p = 0.00004$ OR = 5.00 95%CI = 2.13612.4).

No association was found with the IL18 promoter polymorphism and the age at diagnosis of T1D.

Eight haplotypes were found in our population as showed in Table 2. The haplotypes -656G/-607C/-137G, -656T/-607A/-137C and -656T/-607A/-137G represent more than 80% of all haplotypes in the studied populations, the other five ones were rare. All SNPs were in linkage disequilibrium ($D^i > 0.8$) in all groups, excluding the -656 and -137 SNPs in the T1D + AITD + DC+ and healthy groups ($D^i = 0.6$).

The haplotype -656G/-607C/-137G and -656T/-607A/-137C were differentially distributed in case subjected when compared with healthy individuals ($p < 0.0000007$).

4. Discussions

T1D is an autoimmune disorder resulted by initial infiltration of Th1 and Th2 lymphocytes in pancreatic islet followed by progressive destruction of beta-cells [15,16]. The predominance of Th1 response is widely associated with T1D onset due to a higher production of interferon- γ (INF- γ) [17]. However, genetic studies on INF- γ listed some rare variants with low phenotypic impact [18], suggesting other genetic approaches on the regulation of INF- γ production by the IL-18 pathway in synergy with IL-12. In fact, IL-18 was originally named as an INF- γ -inducing factor with a correlation between genetic SNP at promoter site of IL18 and INF- γ production and T1D development [10].

The -607A and -137C SNPs are known to down-regulate the gene expression of IL18 at the transcriptional level by disrupting the cAMP-responsive element-binding site and by changing the H4TF-1 nuclear factor binding at IL18 promoter [10]. Both events could influence, at least in part, the INF- γ production.

In the present report, the allele -137G and genotype -137GG were associated with the susceptibility to T1D. In addition, the haplotype -656G/-607C/-137G was more frequent in case subjects. Both results supported the hypothesis that lower levels of IL-18 are protective to T1D onset. Several findings have been supporting that increased levels of IL-18 are associated with the susceptibility to T1D. The plasma levels of IL-18 in T1D patients are increased in subclinical stage and involved with disease

Table 1
Interleukin 18 polymorphisms genotypes and allele frequencies of diabetes mellitus type 1 patients stratified according to the insurgence of autoimmune thyroid (AITD) and celiac disease (CD).

		T1D + AITD + CD+ n = 6 (%)	T1D + AITD + CD- n = 38 (%)	T1D + AITD - CD+ n = 10 (%)	T1D + AITD - CD- n = 127 (%)	T1D+ n = 181 (%)	Healthy n = 122 (%)
-656	G	8 (67)	40 (53)	13 (65)	153 (60)	214 (59)	122 (50)
	T	4 (33)	36 (47)	7 (35)	101 (40)	148 (41)	122 (50)
	G/G	3 (50)	9 (24)	5 (50)	42 (33)	59 (33)	29 (24)
	G/T	2 (33)	22 (58)	3 (30)	69 (54)	96 (53)	64 (52)
	T/T	1 (17)	7 (18)	2 (20)	16 (13)	26 (14)	29 (24)
-607	C	7 (58)	40 (53)	15 (75)	146 (57)	208 (57)	131 (54)
	A	5 (42)	36 (47)	5 (25)	108 (43)	154 (43)	113 (46)
	C/C	2 (33)	9 (24)	6 (60)	39 (31)	56 (31)	34 (28)
	C/A	3 (50)	22 (58)	3 (30)	68 (54)	96 (53)	63 (52)
	A/A	1 (17)	7 (18)	1 (10)	20 (16)	29 (16)	25 (20)
-137	G	8 (67)	55 (72)	18 (90)	178 (70)	259 (72)	137 (56)
	C	4 (33)	21 (28)	2 (10)	76 (30)	103 (28)	107 (44)
	G/G	3 (50)	19 (50)	8 (80)	59 (46)	89 (49)	40 (33)
	G/C	2 (33)	17 (45)	2 (20)	60 (47)	81 (45)	57 (47)
	C/C	1 (17)	2 (5)	0 (0)	8 (6)	11 (6)	25 (20)

Associations according to SNP position:		Associated allele	Associated genotype
-656	T1D + AITD - CD- vs healthy	T: p = 0.02 OR = 0.66 95%CI = 0.4560.95	T/T: p = 0.02 OR = 0.38 95%CI = 0.1660.88
	T1D + vs healthy	T: p = 0.03 OR = 0.69 95%CI = 0.4960.97	T/T: p = 0.02 OR = 0.44 95%CI = 0.2060.93
-137	T1D + AITD + CD- vs healthy	G: p = 0.01 OR = 2.04 95%CI = 1.1363.78	G/G: p = 0.01 OR = 5.83 95%CI = 1.23655.9
	T1D + AITD - CD + vs healthy	G: p = 0.003 OR = 6.99 95%CI = 1.61663.5	G/G: p = 0.017 OR = 5.61 95%CI = 1.04656.93
	T1D + AITD - CD- vs healthy	G: p = 0.0015 OR = 1.82 95%CI = 1.2462.69	G/G: p = 0.00051 OR = 4.55 95%CI = 1.77612.9
	T1D + vs healthy	G: p = 0.00012 OR = 1.96 95%CI = 1.3762.80	G/G: p = 0.00004 OR = 5.00 95%CI = 2.13612.4

Table 2
The haplotype distribution of interleukin 18 polymorphisms, at -656/-607/-137 promoter position, in diabetes mellitus type 1 patients stratified according to the insurgence of autoimmune thyroid (AITD) and celiac disease (CD).

Haplotypes	T1D + AITD + CD+ n = 12 (%)	T1D + AITD + CD- n = 76 (%)	T1D + AITD - CD+ n = 20 (%)	T1D + AITD - CD- n = 254 (%)	T1D+ n = 362 (%)	Healthy n = 244 (%)
-656G/-607C/-137G	7 (58.4)	37 (48.7)	13 (65)	140 (55)	195 (54)	95 (38.9)
-656T/-607A/-137C	3 (25)	20 (26.3)	2 (10)	61 (24)	87 (24)	84 (34.4)
-656T/-607A/-137G	1 (8.3)	12 (15.8)	3 (15)	33 (13)	51 (14)	19 (7.8)
Rare haplotypes	1 (8.3)	7 (9.2)	2 (10)	20 (8)	29 (8)	46 (18.9)

Associations found:		Haplotype
Comparison	T1D + AITD - DC + vs healthy	-656T/-607A/-137C OR = 1
	T1D + AITD - DC- vs healthy	OR = 1
	T1D + vs healthy	OR = 1
		-656G/-607C/-137G p = 0.01 OR = 5.70 IC95% 1.23653.5 p = 0.0010 OR = 2.02 IC95% 1.363.15 p = 0.0005 OR = 1.97 IC95% 1.3162.97

progression [17,19]. Moreover, NOD mice with IL-18 deficiency are protected of T1D progression, since they exhibit reduced T cell turnover and fewer effectors T cell [11,20].

However, the contribution of genetic variation at IL18 promoter on T1D onset remains on debate. Kretowski et al. [11], in a Polish population, described that the -137GC genotypes in combination with -607AA gene was associated with susceptibility to T1D, but noted an increase in the frequency of -137C allele in T1D patients. In Chinese Han and Japanese populations the -607C alleles and -607CA genotype, respectively, and the haplotypes -607C/-137G were more frequently in T1D patients [12,13]. These data are according with the present report.

In contrast, independent association studies performed in Iranian, Czech and England populations did not find association of IL18 promoter SNPs with the susceptibility to T1D [21,24]. Moreover, a recent meta-analysis study of the SNP -607 CA, using several autoimmune disorder, reported no correlation with diabetes onset [25]. As well no association was found with the insurgence of AITD and CD in T1D

patients, suggesting that the inflammatory pathway triggered by IL-18 are not shared in these disorder.

The pathogenesis of autoimmune diabetes is complex and not influenced only by genetic profile, but environmental factors could play an important role. As Dong et al. [12] observed the genetic pool diversity and different environmental conditions might contribute to achieve opposite results in different populations of IL18 association.

In summary, our results showed an association of the -137G SNP at promoter of IL18 with the susceptibility to develop T1D in Brazilian patients. Brazilian individuals from Northeast who carry this allele are more than 1.8 times more susceptible to T1D onset (OR = 1.82 95%CI = 1.2462.69) and almost 2.0 times more if they carry the haplotype -656G/-607C/-137G (OR = 1.97 IC95% 1.3162.97). However, those SNPs are not involved with the age at T1D diagnose and the insurgence of AITD and/or CD in concomitant with T1D patients. It is important to note that after T1D patients subgrouping some subclasses remain very small, presenting wide confidence intervals. The a priori power test indicated that according to the SNP frequencies the

sample size in each subclass were reliable to ensure the statistically significant results with power up to 95%. However, further robust analysis must be performed to increase the numbers of sample and diminish the effect of sample size in order to expand the knowledge of IL18 variations on T1D development and the insurgence of others autoimmune disorders.

Acknowledgements

The authors thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PNPD program) for the financial support. NT, MS, RN, RG and LB are recipients of post-graduate and pos-doctoral fellowship from Fundação Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

References

- [1] Abiru N, Kawasaki E, Eguchi K. Current knowledge of Japanese type 1 diabetic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev* 2002;18:357666.
- [2] Pham-Short A, Donaghue KC, Ambler G, Chan AK, Craig ME. Coeliac disease in Type 1 diabetes from 1990 to 2009: higher incidence in young children after longer diabetes duration. *Diabetes Med* 2012;29:28669.
- [3] Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, Cooper JD, Downes K, Yang JH, et al. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med* 2008;359:276777.
- [4] Larizza D, Calcaterra V, Klersy C, Badulli C, Caramagna C, Ricci A, et al. Common immunogenetic profile in children with multiple autoimmune diseases: the signature of HLA-DQ pleiotropic genes. *Autoimmunity* 2012;45:47065.
- [5] Baumann B, Salem HH, Boehm BO. Anti-inflammatory therapy in type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 2012;12:4996509.
- [6] Hulme MA, Wasserfall CH, Atkinson MA, Brusko TM. Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes. *Diabetes* 2012;61:14622.
- [7] Kunz M, Ibrahim SM. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. *Mediators Inflamm* 2009;979258678.
- [8] Reddy P. Interleukin-18: recent advances. *Curr Opin Hematol* 2004;11:405610.
- [9] Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 1999;10:127636.
- [10] Giedraitis V, He B, Huang WX, Hillert J. Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. *J Neuroimmunol* 2001;112:146652.
- [11] Kretowski A, Mironczuk K, Karpinska A, Bojaryn U, Kinalski M, Puchalski Z, et al. Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51:334769.
- [12] Dong GP, Yu ZS, Liang L, Zou CC, Fu JF, Wang CL. IL-18 gene promoter -137C/G and -607C/A polymorphisms in Chinese Han children with type 1 diabetes mellitus. *Int J Immunogenet* 2007;34:7569.
- [13] Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Kobayashi M, Fukushima T, et al. Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Japanese patients with type 1 diabetes. *J Autoimmun* 2004;22:7368.
- [14] Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006;29(Suppl 1):S4368.
- [15] Cebeci AN, Nuhoglu Y, Arslanoglu I, Erguven M, Agachan N. The role of IL-18 in Th1/Th2 balance in children. *Allergy Asthma Proc* 2006;27:365670.
- [16] Rachmiel M, Bloch O, Bistrizter T, Weintrob N, Ofan R, Koren-Morag N, et al. TH1/TH2 cytokine balance in patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma. *Cytokine* 2006;34:17066.
- [17] Nicoletti F, Conget I, Di Marco R, Speciale AM, Morinigo R, Bendtzen K, et al. Serum levels of the interferon-gamma-inducing cytokine interleukin-18 are increased in individuals at high risk of developing type 1 diabetes. *Diabetologia* 2001;44:309611.
- [18] Giedraitis V, He B, Hillert J. Mutation screening of the interferon-gamma gene as a candidate gene for multiple sclerosis. *Eur J Immunogenet* 1999;26:25769.
- [19] Rachmiel M, Bloch O, Shaul AA, Ben-Yehudah G, Bistrizter Z, Weintrob N, et al. Young patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma have a unique IL-12 and IL-18 secretory pattern. *Pediatr Diabetes* 2011;12:5966603.
- [20] Marleau AM, Sarvetnick NE. IL-18 is required for self-reactive T cell expansion in NOD mice. *J Autoimmun* 2011;36:263677.
- [21] Martin RJ, Savage DA, Carson DJ, Maxwell AP, Patterson CC. Interleukin 18 promoter polymorphisms are not strongly associated with type 1 diabetes in a UK population. *Genes Immun* 2005;6:17164.
- [22] Mojtahedi Z, Naeimi S, Farjadian S, Omrani GR, Ghaderi A. Association of IL-18 promoter polymorphisms with predisposition to Type 1 diabetes. *Diabet Med* 2006;23:23569.
- [23] Novota P, Kolostova K, Pinterova D, Novak J, Treslova L, Andel M, et al. Interleukin IL-18 gene promoter polymorphisms in adult patients with type 1 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes in adults. *Immunol Lett* 2005;96:247651.
- [24] Szeszko JS, Howson JM, Cooper JD, Walker NM, Twells RC, Stevens HE, et al. Analysis of polymorphisms of the interleukin-18 gene in type 1 diabetes and Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Diabetes* 2006;55:559662.
- [25] Pan HF, Leng RX, Ye DQ. Lack of association of interleukin-18 gene promoter -607 A/C polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. *Lupus* 2011;20:94565

