



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO  
AMBIENTE – PPGSHMA**

**GLÁUCIA ALYNE NUNES DE LACERDA**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS PROXIMAIS DO  
GENE DA INTERLEUCINA-10 EM PACIENTES  
COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E  
COMORBIDADES AUTOIMUNES DO ESTADO DE  
PERNAMBUCO**

**Vitória de Santo Antão**

**2015**

**GLÁUCIA ALYNE NUNES DE LACERDA**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS PROXIMAIS DO  
GENE DA INTERLEUCINA-10 EM PACIENTES  
COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E  
COMORBIDADES AUTOIMUNES DO ESTADO DE  
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães

Coorientadora: Profa. Dra. Nathália de Alencar Cunha Tavares

**Vitória de Santo Antão**

**2015**

Catálogo na Fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Jaciane Freire Santana CRB4 2018

- L131a Lacerda, Gláucia Alyne Nunes de.  
Análise de polimorfismos proximais do gene da interleucina-10 em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e comorbidades autoimunes do estado de Pernambuco / Gláucia Alyne Nunes de Lacerda. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.  
xvii, 51 folhas; il., tab.
- Orientador: Rafael Lima Guimarães  
Coorientadora: Nathália de Alencar Cunha Tavares  
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2015.  
Inclui bibliografia e anexos.
1. Diabetes Mellitus Tipo 1. 2. Doença Celíaca. 3. Tireoidite Autoimune. I. Guimarães, Rafael Lima (Orientador). II. Tavares, Nathália de Alencar Cunha. III. Título.

616.4622 CDD (23.ed.)

**BIBCAV/UFPE-38/2015**



Dissertação de Mestrado apresentada por **Gláucia Alyne Nunes de Lacerda** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título “**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS PROXIMAIS DO GENE DA INTERLEUCINA-10 EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E COMORBIDADES AUTOIMUNES DO ESTADO DE PERNAMBUCO**”, orientada pelo Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães e coorientada pela Profa. Dra. Nathália de Alencar Cunha Tavares, aprovada no dia 27 de fevereiro de 2015 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

---

**Dr. José Eduardo Garcia**  
Núcleo de Biologia – CAV/UFPE

---

**Dra. Paula Carolina Valença Silva**  
Núcleo de Enfermagem – CAV/UFPE

---

**Dra. Paula Sandrin Garcia**  
Núcleo de Genética – UFPE

Autora

---

**Gláucia Alyne Nunes de Lacerda**

**Dedico à minha família pelo amor e apoio  
e a Sebastião Lopes pela confiança e oportunidade de estudo.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora das Graças, por sempre me concederem sabedoria nas escolhas, coragem para acreditar, força para continuar e proteção para me amparar.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães pela oportunidade de realizar este trabalho, por acreditar em mim, pela paciência e compreensão.

À minha coorientadora Dra. Nathália de Alencar que teve um papel chave na conclusão do meu mestrado, pela confiança, ensinamento, atenção e incentivo.

Ao Prof. Dr. Sergio Crovella pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa.

Aos Prof<sup>os</sup> Lucas Brandão, Paula Sandrin e José Eduardo pelo apoio e atenção.

À Jaqueline, Manuella, Ronaldo e Natassia pela ajuda diária no laboratório.

À Dra Jaqueline, Enfermeira Kiara e equipe do Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas- PE

À minha amada avó (Ana) (saudades eternas), que através do amor me guiou na direção correta e me ensinou a ter fé na vida, a lutar e nunca desistir diante das dificuldades.

À minha mãe (Nadja) que através de seu testemunho me ensinou a ultrapassar todos os obstáculos e vencer os desafios.

Às minhas irmãs, sobrinhos e cunhado (Jessica Whilma, Pedro, Júlia e Maurinho) pelo amor e motivação incondicional.

Ao Senhor Sebastião Lopes (eternas saudades) que acreditou no meu potencial e financiou os meus estudos no Ensino Médio.

Aos meus amigos da UTI do Hospital das Clínicas, do Pronto-Atendimento de Camela-Ipojuca e do Caps ad - Maceió pelo apoio, amizade, ajuda e torcida.

Aos meus amigos: Aldenir, Ana Paula, Suianne que apesar da distância estão presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos colegas do laboratório pelos momentos de trabalho e descontração.

Aos meus queridos amigos: Rosinha, Marcelo, Jack, Dona Ilza, Gesilda e Zezé pela força e torcida. A todos que de alguma forma ajudaram a construir esse trabalho. Com certeza, ele é resultado de uma equipe.

E por fim, aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FACEPE pelo financiamento deste trabalho.

É preciso força para sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.

Esperai tanto por esse momento. E agora ele chegou.

Valeu a pena eh eh (Marcelo Camelo/Marcos Lobato)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b>	x
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1.1 Introdução</b>	1
<b>1.2 Objetivos</b>	3
1.2.1 Objetivo Geral	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
<b>1.3 Revisão da Literatura</b>	4
1.3.1 Diabetes Mellitus	4
1.3.2 Diabetes Mellitus Tipo 1	5
1.3.2.1 DM1: Epidemiologia	6
1.3.2.2 Fatores Ambientais	7
1.3.2.3 Patogênese do DM1	8
1.3.2.4 Fatores Genéticos associados ao DM1	10
1.3.2.5 Diagnóstico e Tratamento	13
1.3.2.6 DM1 e outras doenças autoimunes	14
1.3.3 Sistema Imune	15
1.3.3.1 Citocinas	19
1.3.3.2 Interleucina-10 (IL-10)	20
1.3.4 Gene <i>IL10</i>	21
1.3.4.1 Polimorfismos Genéticos e IL-10	22
<b>CAPÍTULO 2</b>	25
<b>Associação entre Interleucina-10 e Diabetes Mellitus Tipo 1 em uma população brasileira</b>	
<b>2.1 Resumo</b>	26
<b>2.2 Abstract</b>	27

<b>2.3 Introdução</b>	28
<b>2.4 Material e Métodos</b>	30
<b>2.4.1 Estudo de Genotipagem</b>	30
2.4.1.1 Pacientes e Indivíduos saudáveis	30
2.4.1.2 Coleta de Dados	30
2.4.1.3 Seleção dos SNPs e genotipagem do gene <i>IL10</i>	31
2.4.1.4 Análises Estatísticas	31
<b>2.4.2 Ensaio de Expressão do gene <i>IL10</i></b>	31
2.4.2.1 Amostra	31
2.4.2.2. Extração do RNA	32
2.4.2.3. Síntese do cDNA	32
2.4.2.4 Análise do Ensaio de Expressão Gênica	32
<b>2.5 Resultados</b>	32
<b>2.5.1 Estudo de Genotipagem</b>	32
<b>2.5.2. Ensaio de Expressão Gênica</b>	35
<b>2.6 Discussão</b>	36
<b>2.7 Conclusão</b>	37
<b>2.8 Referências</b>	38
<b>3. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES</b>	41
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	44
<b>ANEXOS</b>	xvi
ANEXO A- CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA	
ANEXO B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	xvii
	xviii

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1.1** Corte histológico demonstrando o quadro de insulite: infiltrado de células mononucleares: macrófagos e linfócitos T CD4+ e CD8+ nas ilhotas do pâncreas. Fonte: Adaptado de Thrower; Bingley, 2014. 9
- Figura 1.2** Representação do risco relativo de Genes não-HLA para o desenvolvimento de Diabetes tipo 1. Fonte: Adaptado de Todd, 2010. 11
- Figura 1.3** Modelo de patogênese do DM1 com base genética, no qual são apresentados genes que codificam MHC de classe II, I, I (não-clássico), células apresentadoras de antígenos, pré-pro-insulina (INS) no timo, em células Treg e citocinas. Também é apresentada a influência de infecções virais, e produção e efeitos do Interferon tipo 1 (INF1), além das principais células imunológicas (Células TCD4+, T CD8+, Treg e células B) atuando em conjunto na destruição das células  $\beta$  do pâncreas. Adaptado de Tood, 2010. 12
- Figura 1.4** Diferenciação das células CD4+ naive de acordo com o estímulo produzido com destaque para as citocinas indutoras da diferenciação Th1, Th2, Th17 e TREG e as principais citocinas secretadas. **Fonte:** Adaptado de Souza et al.,2010. 17
- Figura 1.5** Representação do Gene *IL10* localizado no cromossomo 1q31-32. Observe os exons, região promotora e SNPs. **Fonte:** Adaptado de Shin et al, 2000. 22
- ### Capítulo 2
- Figura 2.1** Representação do bloco de haplótipos formados pelos três SNP, mostrando o desequilíbrio de ligação entre eles, com um  $D'=0.99$  entre o rs1800871 e rs1800872. 34
- Figura 2.2** Níveis de expressão de IL-10 nos pacientes DM1 comparados com os controles, os quais foram normalizados para 1. 35

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

<b>Tabela 1.1</b>	Número estimado de criança (0 -14 anos) com DM1 nas regiões do IDF em 2013	7
-------------------	--	---

### Capítulo 2

<b>Tabela 2.1</b>	Distribuição das frequências alélicas e genotípicas nos pacientes DM1, controles e subgrupos: AITD e CD.	33
<b>Tabela 2.2</b>	Distribuição das frequências haplotípicas nos pacientes e controles e a associação dos haplótipos com DM1.	34
<b>Tabela 2.3</b>	Expressão de mRNA do gene <i>IL10</i> em pacientes DM1 estratificados por idade de diagnóstico do DM1.	35

## LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
$\beta$	Beta
%	Porcentagem
+	Mais
A	Alfa
$\Gamma$	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\mu\text{L}$	Microlitros

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

Sigla	Português	Inglês
ADA	Associação Americana de Diabetes	
AITD	Tireoidite Autoimune	Autoimmune Thyroiditis
APC	Célula Apresentadora de Antígeno	
APS	Síndrome Poliendócrina Autoimune	
AR	Artrite Reumatóide	
ATPO	Anticorpo Antiperoxidase	
ATTG	Antitransglutaminase	
AVE	Acidente Vascular Encefálico	
CD	Células Dendríticas	
CD4+	Linfócitos T auxiliares	
CD8+	Linfócitos T citotóxicos	
CGM	Monitorização contínua de glicose	
CI	Intervalo de Confiança	
CSII	Terapia com bomba de infusão contínua	
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócito T citotóxico	
DAC	Doença Arterial Coronariana	
DC	Doença Celíaca	Celiac Disease
DIAMOND		Diabetes Mondiale
DM	Diabetes Mellitus	
DM1/ T1D	Diabetes Mellitus Tipo 1	Type 1 diabetes
DM2	Diabetes Mellitus do Tipo 2	
DNA	Ácido Desoxirribonucléico	
EUA	Estados Unidos da América	
EURODIAB		Europe Diabetes
FC	Diferença de Expressão	Fold Change
GAD	Anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico	
GWAS	Estudos amplos de associação do genoma	Genome wide association study
HLA	Antígeno Leucocitário Humano	
IA2	Anticorpo antitirosina fosfatase	
IAA	Anticorpo anti-insulina	
ICA	Anticorpo anti-ilhota pancreática	
IDF	Federação Internacional de Diabetes	Internacional Diabetes Federation
IFN- $\gamma$		Interferon-gama

Ig	Imunoglobulinas	
IL-10	Interleucina-10	Interleukin-10
IL10R1	Subunidade 1 do receptor da IL-10	
IL10R2	Subunidade 2 do receptor da IL-10	
ILR	Receptor de Interleucina	
IMIP	Instituto Materno Infantil	
LADA	Diabetes Autoimune Latente do Adulto	
LB	Límfócitos B	
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico	
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade	
NK	Matadoras assassinas	Natural Killer
OMS	Organização Mundial de Saúde	
OR	Odds-ratio	
PCR	Reação em cadeia de polimerase	
PTPN22	Proteína tirosino-fosfatase não receptor tipo 22(linfoide)	
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real	
RNA	Acido Ribonucléico	
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes	
SNP	Polimorfismos de única base	
T1DGC	Consórcio Genético de Diabetes Tipo 1	
T4	Tiroxina	
Th	Células T auxiliares	Cells T helper
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa	
Treg	Células T regulatórias	
TSH	Hormônio Estimulante da Tireoide	
UV	Ultravioleta	
ZnT	Antitransportador de Zinco	

## RESUMO

O Diabetes Mellitus do tipo 1 (DM1) é uma doença multifatorial, caracterizada pela destruição autoimune das células  $\beta$  pancreáticas. Além do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), várias regiões não HLA foram descritas como importantes para o desenvolvimento da doença, principalmente as que possuem efeito sobre o sistema imune. Dessa forma, este estudo objetivou avaliar a associação de polimorfismos de base única (SNPs) do gene da Interleucina-10 (IL-10), bem como seus níveis de expressão, na susceptibilidade ao DM1, correlacionar com o surgimento de doença celíaca (DC) e tireoidite autoimune (AITD), e com a idade de diagnóstico, em pacientes pernambucanos. Os SNPs estudados foram os rs1800896, rs1800871 e rs1800872, todos funcionais e localizados na região promotora do gene. Os ensaios de expressão e genotipagem foram realizados através de PCR em tempo real, com sondas TaqMan. O gene da IL 10 apresentou maiores níveis de expressão nos pacientes DM1 em relação aos controles ( $p$ -value = 0,02), assim como na faixa etária de 7 a 11 anos ( $p$ -value = 0,04), sendo mais expresso em pacientes com diagnóstico de DM1 mais precoce. Com relação aos SNPs, foi encontrada associação do rs1800871 com o diagnóstico tardio ( $p$ -value = 0,02). Não foi encontrada associação dos SNPs com a susceptibilidade ao DM1 ou dessa desordem associado a AITD e DC. Assim, esse estudo sugere a participação da IL-10 na patogênese da doença, contribuindo para o quadro inflamatório de insulite, característico do DM1.

**Palavras-chave:** Autoimunidade. Diabetes mellitus tipo 1. Interleucina-10. SNPs.

## ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is a multifactorial disease, characterized by autoimmune destruction of pancreatic insulin-producing  $\beta$  cells. Several non-HLA regions are described as being important for the development of the disease, and studies of genes in this region, especially having effect on the immune system, is being conducted. Thus, this study aimed to evaluate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of Interleukin-10 (*IL-10*) gene, as well as its expression levels, with the development of T1D and other autoimmune diseases (celiac and autoimmune thyroiditis) and correlate with onset of T1D in a population of Brazilian northeast. The *IL-10* SNPs studied were rs1800896, rs1800871 and rs1800872; all are functional and located in the promoter region of the gene. The assay genotyping of SNPs and gene expression was carried out by polymerase chain reaction (PCR) in real time, using TaqMan probes. The *IL-10* gene was upregulated in T1D patients compared to controls (p-value 0.02). The same was observed in the group with higher age of T1D onset (p-value 0.04). Regarding to SNPs genotyping, it was found an association of rs1800871 with premature diagnosis (p-value 0.02). There was no association of SNPs with susceptibility to T1D, or the T1D associated with AITD and CD. Thus, this study suggests the involvement of IL-10 in the pathogenesis of the disease, contributing to the discovery of biomarkers for risk of T1D in our population.

**Keywords:** Autoimmunity. Interleukin-10 I. Type 1 diabetes. SNPs

# CAPÍTULO 1

## 1.1 Introdução

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune, multifatorial, órgão-específica, desencadeada por fatores genéticos e ambientais, especialmente infecções (TODD,2010). Caracteriza-se pela destruição das células beta ( $\beta$ ) do pâncreas com consequente deficiência de insulina. (BLUESTONE J. A; HEROLD K; EISENBARTH G.,2010; STECK; REWERS, 2011). O componente genético no DM1 é muito forte, prováveis genes de susceptibilidade já foram mapeados em cerca de 60 loci. Contudo, como a perda da autotolerância acontece ainda não está completamente elucidada (BAKAY; PANDEY; HAKONARSON, 2014).

O DM1 representa 5% a 10% dos casos de diabetes, sendo uma das doenças crônicas mais comuns em crianças e adolescentes (STECK; REWERS, 2011). Dados indicam que a incidência do DM1 cresce em torno de 3% ao ano, em todo o mundo. A incidência é maior na Europa e nos Estados Unidos (EUA) (ADA, 2014).

A incidência de DM1 mostra acentuada variação geográfica, apresentando taxas de 38,4 na Finlândia, 7,6 no Brasil e 0,5 na Coreia, para cada 100 mil indivíduos menores de 15 anos. Atualmente, sabe-se que a incidência de DM1 vem aumentando, particularmente, na população infantil com menos de 5 anos de idade (SBD, 2014). Esse aumento na incidência do DM1 pode ser explicado pelo caráter multifatorial da doença e diversas teorias associam a exposição dos indivíduos aos fatores diabetogênicos como vírus, deficiência de vitamina D, leite de vaca (EGRO, 2013).

É importante enfatizar que o ponto crítico do DM1 consiste no processo cumulativo da autoimunidade, uma vez que o ataque às células  $\beta$  do pâncreas continua acontecendo mesmo com a reposição da insulina. Esse quadro cumulativo pode promover a insurgência de outras doenças autoimunes, como a Tireoidite Autoimune (AITD), a Doença Celíaca (DC), a Doença de Addison e a Síndrome Poliglandular (APS) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os linfócitos T CD4+ podem se diferenciar em diversos tipos celulares secretando diferentes citocinas, as quais apresentam papel crucial na patogênese do DM1. Estas citocinas podem apresentar ação pró-inflamatória, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1), ou anti-inflamatória, como a interleucina 4 (IL-4). No entanto, apesar do mecanismo pelo qual essas citocinas atuam na patogênese do DM1 não estar completamente elucidado, sabe-se que ocorre um

desequilíbrio entre as respostas imunológicas Th1, Th2 e Th17 (ROITT; DELVES, 2004).

A IL-10 é uma citocina do grupo Th2 dita pleiotrópica, pois, além de apresentar uma ação na regulação negativa nas respostas mediadas por células e na resposta inflamatória, sendo assim uma potente mediadora anti-inflamatória, pode também se comportar como uma citocina pró-inflamatória. É importante ressaltar que o grupo Th2 induz componentes da imunidade anti-células  $\beta$ , principalmente, através da ação promovida pela IL-10 (NG et al., 2013). Foram encontrados dados contraditórios sobre o papel da IL-10 na insulite, quadro inflamatório característico do DM1 (SAXENA et al., 2014).

O gene *IL10* possui várias regiões polimórficas, entre elas, encontram-se três polimorfismos de única base (SNPs), localizados na região promotora do gene nas posições (-A1082G) IL-10 (rs1800896), (-C819T) IL-10 (rs1800871) e (-A592C) IL-10 (rs1800872) (Pubmed) e possivelmente estes SNPs são responsáveis pelas diferenças dos níveis de IL-10 entre os indivíduos (IDE et al., 2002).

Foi hipotetizado que o aumento na expressão da IL-10 acelera o processo de insulite e este aumento está associado à presença dos SNPs.

Assim, novos estudos são necessários para esclarecer o papel da IL-10 no DM1, pois a busca por marcadores de suscetibilidade genética associada à doença mostra-se relevante, na medida em que podem indicar grupos de risco e permitir intervenção precoce, minimizando ou evitando os prejuízos causados pela doença, já que o DM1 traz problemas sociais, econômicos, físicos e psicológicos para os portadores da patologia, levando a distúrbios de autoimagem, insegurança, medo, uma dieta com restrições, internamentos, além da exigência da adesão ao tratamento de crianças e adolescentes. Desta forma, há evidência que essa doença merece especial cuidado no sentido de uma detecção precoce, dos indivíduos susceptíveis, para que haja possibilidade de intervenção profilática nos mesmos.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1. Objetivo geral

Avaliar a associação entre três polimorfismos localizados na região promotora do gene da IL-10 e a susceptibilidade ao DM1, relacionando com o surgimento de doença celíaca e tireoidite autoimune, com a idade do diagnóstico e os níveis de expressão dessa citocina em uma população pernambucana.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Comparar as frequências alélicas, genóticas e haplótipicas dos polimorfismos funcionais (-A1082G) IL-10 (rs1800896), (-C819T) IL-10 (rs1800871), and (-A592C) IL-10 (rs1800872) em pacientes com DM1 e indivíduos controles;
- Avaliar se há associação desses polimorfismos com a susceptibilidade ao DM1;
- Avaliar se há associação desses polimorfismos com a susceptibilidade de insurgência de doença celíaca e tireoidite autoimune nos pacientes com DM1;
- Avaliar a associação dos SNPs com a idade de diagnóstico do DM1;
- Avaliar a associação dos níveis de expressão da IL-10 com o desenvolvimento do DM1, os SNPs e idade de diagnóstico;

## 1.3 Revisão da Literatura

### 1.3.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica, com morbidade e mortalidade significativa, caracterizada pela presença de hiperglicemia. Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes, desde a destruição autoimune das células  $\beta$  do pâncreas, com conseqüente deficiência de insulina para anormalidades que resultam da resistência à ação da insulina (THROWER; BINGLEY, 2014).

Os sintomas de hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva. A hiperglicemia crônica e a desregulação metabólica podem estar associadas à disfunção em vários órgãos, especialmente, rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos, além de déficit no crescimento e susceptibilidade a infecções. (ADA, 2014).

As complicações agudas do diabetes incluem hipoglicemia, cetoacidose diabética e a Síndrome Hiperosmolar não cetótica. As complicações crônicas são retinopatia com potencial perda da visão, nefropatia levando à insuficiência renal, neuropatia periférica, com risco de úlceras e amputações nos pés (ATKINSON; EISENBARTH; MICHEL, 2014). Os pacientes com diabetes apresentam um aumento na incidência de Doença Arterial Coronariana (DAC) e Acidente Vascular Encefálico (AVE), hipertensão e anormalidades do metabolismo de lipoproteínas (CANIVELL; GOMIS, 2014).

Atualmente, mais de 387 milhões de pessoas no mundo têm diabetes; 4.9 milhões de pessoas foram a óbito devido as causas relacionadas ao diabetes (SBD, 2014) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que o diabetes seja a sétima principal causa de morte em 2030 e que mais de 80% das mortes por essa doença ocorrem em países de baixa e média renda (OMS, 2012). No Brasil, cerca de 11,6 milhões de brasileiros têm diabetes. (SBD, 2014).

De acordo com a OMS e a Associação Americana de Diabetes (ADA) classificam o diabetes mellitus em quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional.

O DM1 é o resultado da destruição de células  $\beta$  pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina. O DM2 representa 90% a 95% dos casos de DM e a grande maioria apresenta sobrepeso ou obesidade. É causado por uma combinação de

resistência periférica à ação da insulina e uma resposta secretória inadequada das células  $\beta$  pancreáticas (MAITRA et al, 2010). O DM gestacional trata-se de qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação (ADA, 2014).

Outros grupos específicos de DM são formas menos comuns de DM cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados. A apresentação clínica desse grupo é bastante variada e depende da alteração de base. Estão incluídos nessa categoria defeitos genéticos na função das células  $\beta$ , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, agentes químicos e infecções (OMS, 2012).

### **1.3.2 Diabetes Mellitus Tipo I**

O DM1 é uma doença metabólica, multifatorial, órgão-específica, resultante da interação de fatores genéticos e ambientais (principalmente infecções), com componente genético muito forte (BAKAY; PANDEY, 2014). Caracteriza-se pela destruição das células  $\beta$ -pancreáticas, levando à hiperglicemia pela falta de produção da insulina, sendo necessária a reposição exógena permanente deste hormônio (BLUESTONE et al., 2010; KAWASAKI, 2014).

A ADA propôs uma classificação etiológica do diabetes mellitus tipo 1, com diabetes tipo 1A (DM1A) representando o diabetes imuno-mediado, e tipo 1B (DM1B) uma forma idiopática quando não há evidências do processo autoimune. No DM1A, a taxa de destruição das células  $\beta$  é variável, sendo, em geral, mais rápida entre as crianças. A forma lentamente progressiva ocorre em adultos, sendo referida como diabetes autoimune latente do adulto (LADA, do inglês, *latent autoimmune diabetes in adults*) (CERNEA et al., 2009; SBD, 2014).

O DM1 é uma desordem autoimune e os marcadores de autoimunidade são os autoanticorpos anti-insulina (IAA), antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD), antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2B) e antitransportador de zinco (Znt). Esses anticorpos podem estar presentes meses ou anos antes do diagnóstico clínico, ou seja, na fase pré-clínica da doença, e em até 90% dos indivíduos quando se detecta hiperglicemia (DIB, 2008; SDB, 2014).

### 1.3.2.1 DM1: Epidemiologia

O DM1 é uma das doenças crônicas mais comuns no período da infância, acometendo aproximadamente 2/3 de todos os casos de diabetes em criança, representa 5% a 10% dos casos de diabetes (ADA, 2014).

Dados referentes à incidência do DM1 na infância são muito limitados, porém grandes projetos como Diabetes Mondiale (DIAMOND) e Diabetes Europa (EURODIAB) indicam que, numa base anual, o aumento global seja de cerca de 3%. Estes estudos têm demonstrado aumento das taxas de incidência de DM1 ao longo do tempo, com grande heterogeneidade geográfica (FORLENZA; REWERS, 2011).

A incidência do DM1 varia de 0,1 por 100.000 habitantes, em países como China e Venezuela, a aproximadamente 41 por 100.000 habitantes por ano, na Finlândia, em crianças com idade inferior a 15 anos (FORGA; GOÑI, 2014).

As tendências estimadas para as regiões do Internacional Diabetes Federation (IDF) apresentaram aumentos estatisticamente significativos em todo o mundo. A tabela 1.1 mostra o número de crianças de 0-14 anos com DM1 e o número de novos casos diagnosticados por ano nas regiões IDF. A Europa tem o maior número de crianças com DM1 em comparação com as outras regiões da IDF, cerca de 129.300. A região também tem uma das mais altas taxas de incidência da doença em crianças, com 20 mil novos casos por ano. Os países que mais contribuem com os números globais de DM1 em pessoas jovens são o Reino Unido, Rússia e Alemanha (IDF, 2013).

Há uma estimativa de 108.600 crianças com DM1 na América do Norte e Caribe. Os EUA são responsáveis por cerca de 80% do número total de novos casos da doença em crianças, seguido pelo Canadá. Estima-se que 7.300 crianças desenvolveram DM1, em 2013, em regiões da América do Sul e Central, totalizando 45.600 crianças com idade inferior a 15 anos com a doença. Desse total da América do Sul e Central, cerca de 31.100 crianças vivem no Brasil (IDF, 2013).

A Região do Sudeste da Ásia tem uma das mais altas estimativas de prevalência de DM1 em crianças, com 77.900 afetados. Em 2013, estima-se que 12.600 crianças com menos de 15 anos de idade na região desenvolveram a doença sendo a Índia responsável pela maioria dos casos (IDF, 2013).

Estima-se que 32.500 crianças com idade inferior a 15 anos na Região do Pacífico Ocidental têm DM1, a maior contribuição vem das Filipinas (7.900), seguido de perto pela China (7.700). Na região da África, crianças com DM1 muitas vezes não são diagnosticadas, este fato pode explicar a baixa prevalência da doença na região.

**Tabela 1.1:** Número estimado de crianças (0-14 anos) com DM1 nas regiões do IDF em 2013.

Regiões IDF	Número de crianças com DM1 (mil)	Número de novos casos de DM1 diagnosticados por ano (mil)
África	39.1	6.4
Europa	129.4	20.0
Ámerica do Norte e Caribe	108.6	16.7
Ámerica do Sul e Central	45.6	7.3
Sudeste da Ásia	77.9	12.5
Pacífico Ocidental	32.5	5.3

Fonte: Adaptado de IDF Diabetes Atlas, 6 ed.

Atualmente são estimados cinco milhões de diabéticos do tipo 1 no Brasil e, destes, cerca de 300 mil são menores de 15 anos (NASCIMENTO et al., 2011). Em um estudo realizado por Negrato et al. (2010), no Brasil, entre os anos de 1986 e 2006, foi encontrada uma incidência geral de 10,4 casos de DM1/100.000 habitantes, variando de 2,82/100.000 habitantes em 1987 a 18,49/100.000 habitantes em 2002, representando, assim, um aumento de 6,56 vezes na incidência do DM1 na população brasileira.

### 1.3.2.2 Fatores Ambientais

Apesar de ser fortemente influenciada por fatores genéticos, estudos mostram que um padrão simples de herança não esclarece a patogênese do DM1, por isso é considerado uma doença multifatorial (NOKOFF; REWERS, 2013).

Pesquisa envolvendo agregação familiar precoce e estudos com gêmeos evidenciaram que as taxas de concordância entre a quantidade de gêmeos monozigóticos é de 30% a 50%, enquanto que entre gêmeos dizigóticos é de 6% a 10% e, 85% dos novos casos de DM1 aparecem em indivíduos sem histórico familiar conhecido para a doença. Filhos de mães DM1 apresentam um risco de 2% de desenvolver DM1 (REGNELL; LERMARK, 2013). Estudos têm mostrado que há diferenças regionais na incidência de diabetes que não estão relacionados com a composição étnica da população (FORLENZA; REWERS, 2011). Estes dados revelam a grande contribuição do componente ambiental no desenvolvimento da doença (BELLE, VAN et al., 2011).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a contribuição de fatores ambientais na patogênese do DM1 em todo o mundo, entre estes estão os papéis de infecções, influências dietéticas, poluentes, o ambiente pré-natal, a variação na flora intestinal, exposição de vitamina D, localização geográfica e obesidade (FORGA; GOÑI, 2014; REGNELL; 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  $\beta$  na inflamação (FILIPPI; VON HERRATH, 2008; COPPIETERS *et al.*, 2012). Um estudo recente tem investigado o papel do enterovírus humano como gatilho para autoimunidade do DM1. Este estudo descobriu que ocorre progressão da destruição das células  $\beta$  após infecção por enterovírus (FORGA; GOÑI, 2014).

Algumas substâncias também podem perturbar respostas fisiológicas locais do sistema imune em diferentes condições, considerados como fatores ambientais casuais (BELLE, VAN *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 (VIRTANEN *et al.*, 2000; VAARALA, 2002).

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. 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).

Por fim, a "hipótese da higiene" atribui o aumento da incidência de doença autoimune, em geral, a uma estimulação reduzida ou alterada do sistema imunitário por fatores ambientais. Um estudo nos EUA tem investigado a incidência de DM1 em diferentes grupos socioeconômicos e constataram uma maior incidência da doença em grupos socioeconômicos mais elevados (DRESCHER *et al.*, 2014).

### **1.3.2.3 Patogênese do DM1**

A patogênese do DM1 não está completamente elucidada. Sabe-se que o indivíduo é geneticamente susceptível e agentes ambientais (ainda não definidos) funcionam como gatilho para o início do processo de destruição imunomediado das células  $\beta$ . Com o tempo, a autoimunidade leva à perda ostensiva de células- $\beta$  e ao quadro de diabetes (PUGLIESE, 2013).

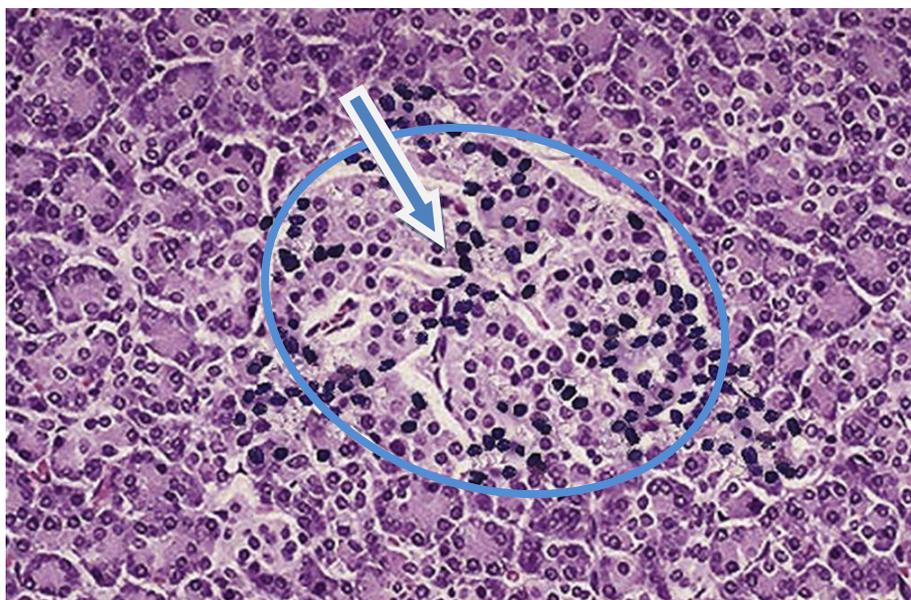
A destruição das células  $\beta$  é através de resposta imune celular. As células T se infiltram nas ilhotas num processo denominado insulite. Análises imunohistoquímicas de tecido pancreático revelam que os primeiros tipos celulares a infiltrarem as ilhotas de Langerhans são as células dendríticas e os macrófagos promovendo o quadro de insulite (Figura 1.1) (THROWER; BINGLEY, 2014).

Os outros tipos de células presentes nas ilhotas são poupados da destruição, entretanto, devido ao maior número de células  $\beta$ , pode ser visualizada uma atrofia das ilhotas nos pacientes DM1 (BALDA; PACHECO-SILVA, 1999).

O mecanismo subjacente ao início e progressão do DM1 não está bem compreendido, no entanto, estudos epidemiológicos fornecem evidências sugestivas de que o processo de destruição das células  $\beta$  pancreáticas inclui a ativação de células T autorreativas, secundária a um encontro com um patógeno por epítomos compartilhados, ou de reação cruzada com antígenos próprios, ou seja, o mimetismo molecular, talvez porque alguns antígenos virais sejam geneticamente semelhantes aos antígenos das células- $\beta$  (PHARM et al, 2013; ATHINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2013).

No processo de autoimunidade, linfócitos T CD4+ são ativados por antígenos de células  $\beta$  e células apresentadoras de antígeno. Estas células ativadas secretam várias citocinas, cuja principal ação é promover a ativação e a proliferação de linfócitos T CD8+ citotóxicos (LTC) e de outras células, incluindo linfócitos B e macrófagos, que infiltram nas ilhotas de Langerhans e começam o ataque às células  $\beta$  (BALDA; PACHECO-SILVA, 1999; THOWER; BINGLEY, 2014).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e interleucina1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) por células apresentadoras de antígeno e células T, conduz a destruição das células  $\beta$  culminando com a falta de produção da insulina e aparecimento do diabetes clínico (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010).



**Figura 1.1:** Corte histológico demonstrando o quadro de insulite: infiltrado de células mononucleares: macrófagos e linfócitos T CD4+ e CD8+ nas ilhotas do pâncreas.  
Fonte: Adaptado de Thrower; Bingley, 2014.

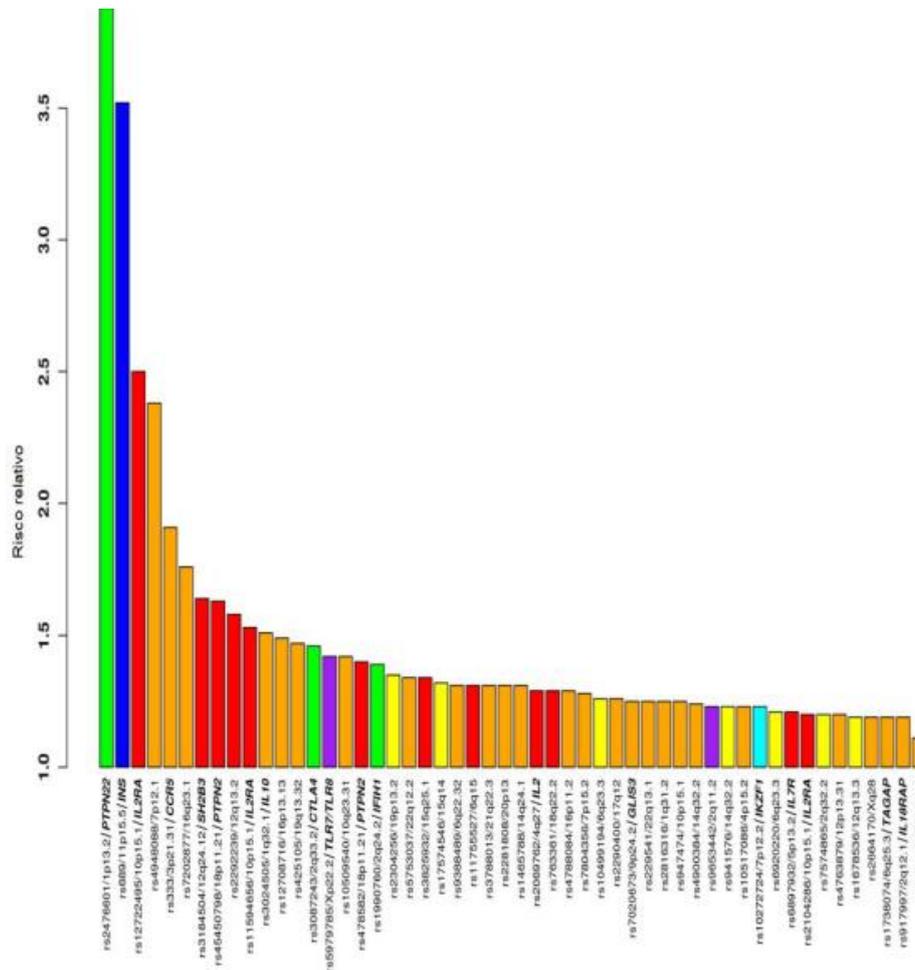
#### 1.3.2.4 Fatores Genéticos associados ao DM1

Como relatado anteriormente, por ter um componente genético muito forte, diversos estudos vêm estabelecendo a importância do genoma humano no desenvolvimento do DM1, dentre esses se destaca o Consórcio Genético de Diabetes Tipo 1 (T1DGC – do inglês type 1 diabetes Genetics Consortium), finalizado em 2010 (NOBLE; ERLICH, 2012). Tal consórcio foi uma colaboração internacional concebida para identificar loci genéticos que podem contribuir para um risco aumentado ao DM1.

O primeiro relato de uma associação genética para o DM1 foi com a região do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), descrita em 1973 por Singal e Blajchman. Para comprovar a importância do componente genético nessa desordem, já foi realizado estudo com pacientes DM1 e familiares (NOBLE; ERLICH, 2012). E foi verificado que esses indivíduos apresentam um risco de desenvolver o DM1 cerca de 20 vezes maior que na população no geral, demonstrando, assim, a importância do componente genético na susceptibilidade à doença (STECK; REWERS, 2011).

O HLA tem uma variabilidade alélica muito grande e fornece cerca de 60% de contribuição para a susceptibilidade genética global do DM1. Existem três classes de genes HLA: DQ, DR, DC. O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe II DR3 e DR4 conferem maior risco a doença. Por outro lado, o alelo de classe II, DQB1 \* 0602, em desequilíbrio de ligação com o DR2, está associado com a proteção do desenvolvimento de DM1 e é encontrado em <1% dos pacientes com DM1 (GROOP; POCIOT, 2014). Além dos genes HLA de classe II, os genes não-HLA também conferem risco genético para o DM1. A partir de estudos de genes candidatos foram estabelecidos mais de 40 genes não HLA como marcadores de susceptibilidade ao DM1.

Outras regiões não-HLA que estão associadas ao surgimento da doença podem ser vistas na figura 1.2.



**Figura 1.2:** Representação do risco relativo de Genes não-HLA para o desenvolvimento de Diabetes tipo1. Fonte: Adaptado de Todd, 2010.

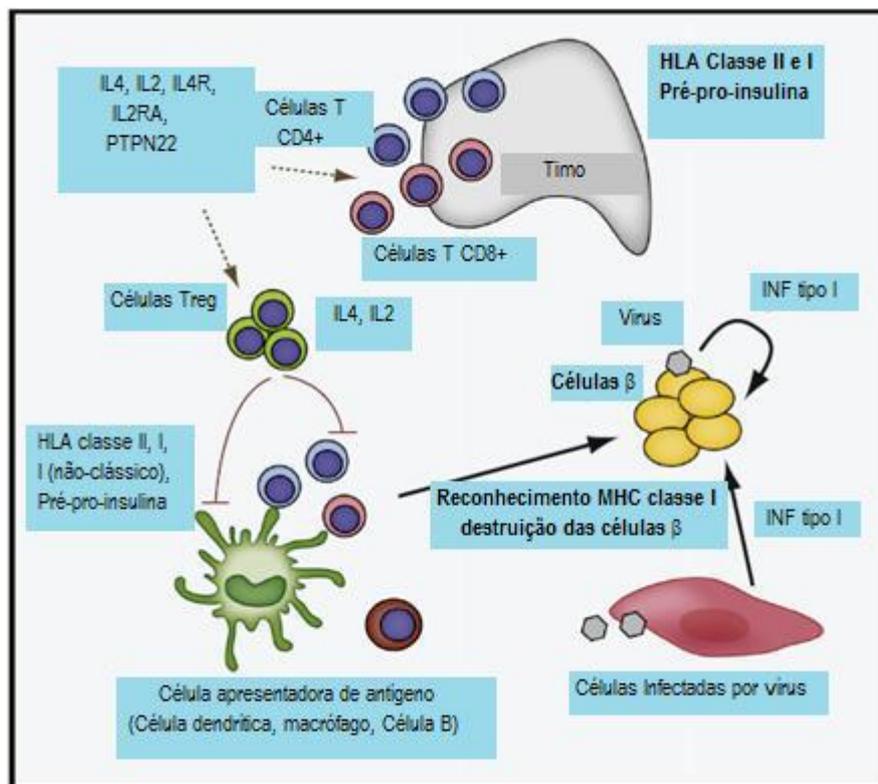
O tirosino fosfatase não receptor tipo 22 (linfóide) (*PTPN22*), que influencia a sinalização do receptor de células T, é identificado como influência de risco ao diabetes (TOOD, 2010). Outro gene que possui polimorfismos associados com a regulação das células T é o antígeno-4 associado a linfócitos T citotóxicos (*CTLA-4*), e alguns estudos apontam com o menor risco genético influenciando o DM1 (FIFE *et al*, 2006; BELLE, VAN *et al.*, 2011).

Variações alélicas no gene do Receptor da Interleucina -2  $\alpha$  (*IL2R $\alpha$* ) representa outra região associada e esse receptor é um elemento essencial após ativação das células T (LISA *et al.*, 2009). Outro receptor importante é o Receptor da IL- 4, que medeia a resposta inflamatória autoimune participando da diferenciação dos linfócitos Th naive, (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. Embora os mecanismos regulatórios que se destinam à autoimunidade das células  $\beta$  estejam estabelecidos, ainda não estão completamente esclarecidos. Importantes fatores genéticos, como o genótipo do HLA classe II e gene da insulina aumentam a probabilidade de iniciar a processo autoimune nas células  $\beta$ , enquanto que os genes não-HLA afetam a evolução da patogênese, no percurso da autoimunidade (LEMPAINEN; ILONEN, 2012).

A maioria desses loci aparenta ter efeitos sobre o sistema imune, particularmente sobre as células T (STECK; REWERS, 2011). Como exemplo destes genes pode-se citar o *INS*, *PTPN22*, *CTLA4*, e *IL2R $\alpha$*  que possuem maior associação com o desenvolvimento de DM1, podendo conferir tanto risco quanto proteção. Eles são essenciais para compreensão da patogênese da doença (LEMPAINEN; ILONEN, 2012; NOKOFF ; REWERS, 2013; TAVARES et al., 2013; SIMMONS; MICHELS, 2014).



**Figura 1.3:** Modelo de patogênese do DM1 com base genética, no qual são apresentados genes que codificam MHC de classe II, I, I (não-clássico), células apresentadoras de antígenos, pré-pro-insulina (*INS*) no timo, em células Treg e citocinas. Também é apresentada a influência de infecções virais, e produção e efeitos do Interferon tipo 1 (INF1), além das principais células imunológicas (Células TCD4+, T CD8+, Treg e células B) atuando em conjunto na destruição das células  $\beta$  do pâncreas. Adaptado de Tood, 2010.

### 1.3.2.5 DM1: Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico clínico do DM1 é realizado através da associação dos sinais e sintomas característicos da patologia, como a polidipsia, poliúria, perda de peso e sonolência em conjunto com os valores da glicemia. (VAN BELLE et al., 2011; ADA, 2014).

Segundo a ADA, a glicemia aleatória > 200 mg/dl ou glicemia de jejum > 126 mg/dl (confirmada em duas ocasiões) ou, ainda, uma glicemia > 200 mg/dl após teste de tolerância à glicose (75 g ou 1,75 g/kg de peso em crianças), hemoglobina glicada acima de 6,5% são características dos pacientes com DM1 (SILVA et al., 2008; ADA, 2014).

A medição dos auto-anticorpos é a forma mais adequada para distinguir o tipo de diabetes (SIMMONS; MICHEL, 2014). Os autoanticorpos estão presentes em 85% a 90% dos indivíduos DM1 quando a hiperglicemia é detectada e também podem ser utilizados como marcadores de diagnóstico (BALDA; PACHECO-SILVA, 1999). Os primeiros anticorpos descritos em associação com DM1 foram os anticorpos anti-ilhota pancreática (ICA), em seguida os anticorpos anti-insulina (IAA), antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD), antitirosina fosfatase (IA2) e, posteriormente, o antitransportador de zinco (HOFFMAN, 2004; MALLONE et al, 2011). Esses anticorpos podem estar presentes há anos, às vezes já na primeira fase da infância, antes do aparecimento clínico da hiperglicemia persistente. A presença de múltiplos autoanticorpos é altamente preditiva para o desenvolvimento do DM1 (BOLLI, 2006; HOFFMAN, 2004).

Por ser uma doença crônica silenciosa, geralmente, no momento do diagnóstico do DM1 restam apenas 10% das células  $\beta$  e, com o passar do tempo, essas se tornam praticamente ausentes (DA SILVA, et al., 2008).

Em alguns casos, principalmente em lactentes e crianças pequenas, o diagnóstico inicial é feito com o quadro de cetoacidose diabética. No DM1 há pouca ou nenhuma secreção de insulina e isso pode ser detectado com níveis baixos ou indetectáveis de peptídeo-C (DA SILVA, et al., 2008).

O DM1 ainda não apresenta cura e não existe um tratamento preventivo ou terapêutico eficaz para impedir, ou minimizar, o processo acumulativo autoimune no paciente. A base do tratamento para DM1 é a administração subcutânea de insulina e controle da glicemia, através de automonitorização com glicosímetro de 4 a 6 vezes por dia (SBD, 2014).

Avanços tecnológicos proporcionam aos pacientes o uso da terapia com bomba de infusão contínua de insulina subcutânea (CSII) que tem efeito na redução

da taxa de eventos hipoglicêmicos em 70%. Esses avanços também permitiram a criação de um sistema de monitorização contínua de glicose (CGM). Com o CGM, um sensor subcutâneo é inserido e a glicose no sangue intersticial é medida continuamente. Uma quantidade significativa de pesquisa é focada na criação de um sistema de circuito fechado, que combine dados CGM com algoritmos para fornecer automaticamente insulina a partir de uma bomba de insulina, que funcionaria autonomamente como um pâncreas artificial (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

Além do tratamento realizado com as injeções de insulina, 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  $\beta$ , o paciente ficaria por mais de ano sem alterações (KEYMEULEN et al., 2005, 2010).

O controle glicêmico e o pressórico são importantes para evitar o desenvolvimento de complicações crônicas do DM. É necessário o acompanhamento do perfil lipídico para prevenção de complicações microvasculares e macrovasculares (SKYLER et al 2005)

Outra opção de tratamento é o transplante do pâncreas que apesar de, nos últimos anos, ser uma abordagem terapêutica bem sucedida (BURKE; CIANCIO; SOLLINGER, 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).

#### **1.3.2.6 DM1 e outras doenças autoimunes**

A autoimunidade dos pacientes com DM1 é um processo acumulativo, pois o tratamento atual realizado com a insulina não impede o processo autoimune, sendo assim, os linfócitos continuam atacando as células produtoras de insulina. Em adição, esse quadro, possivelmente, promove o surgimento de outras doenças autoimunes, sendo um fato já confirmado pelo aumento na frequência, por exemplo, da doença celíaca em indivíduos portando o DM1 (COHN et al., 2014).

De fato, um em cada três pacientes portadores do DM1 não limita o ataque autoimune às células  $\beta$ . Portanto, é comum que esses pacientes apresentem a

chamada Síndrome Poliendócrina Autoimune (APS), que são caracterizadas por insuficiência funcional de vários órgãos endócrinos, secundárias a um processo destrutivo imunologicamente mediado (ANDERSON, 2008).

As APS são divididas em tipo I, II e III de acordo com a idade de ocorrência da endocrinopatia, modelo de hereditariedade e relacionamento com o complexo HLA (ROJAS-VILLARRAGA et al., 2013).

A APS tipo I é caracterizada pela tríade clássica de candidíase mucocutânea (90-100%), hipoparatiroidismo (80-85%) e doença de Addison (70-75%) que aparecem em uma ordem cronológica. Para o diagnóstico, pelo menos, dois dos três principais componentes devem estar presentes. Já a APS tipo II é caracterizada pela presença da doença de Addison (100%), em associação com as doenças autoimunes da tireóide e/ou DM1. É o tipo mais comum encontrado clinicamente (ANAYA; ROJAS-VILLARRAGA; CARRASCO, 2012).

Já a APS tipo III mostra uma associação direta de doença autoimune da tireóide (tireoidite de Hashimoto, doença de Graves) e DM1 e encontra-se na ausência da doença de Addison. É uma condição muito rara e a prevalência mundial exata do APS tipo III é desconhecida. (EISENBARTH, 2004; HANSEN; KAHALY, 2013).

Dos portadores de DM1, cerca de 15-30% apresentam a doença autoimune da tireoide (Hashimoto ou Doença de Graves) e cerca de 4 a 9% irão desenvolver a Doença Celíaca, além de poderem apresentar a anemia perniciosa (5-10%), doença de Addison (0,5%) e, em torno de 2-10% manifestar o vitiligo. Tais indícios sugerem que essas doenças possam compartilhar vias patogênicas similares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; QUEIROZ, 2008).

A presença de outras doenças autoimunes em pacientes com DM1 tem sido associada com o aumento da morbidade e mortalidade. Dessa forma, a detecção precoce de anticorpos e disfunção específica do órgão latente é defendida para alertar os médicos para tomar as medidas adequadas a fim de prevenir o avanço da doença (ANAYA et al., 2012; ROJAS-VILLARRAGA et al., 2012).

### **1.3.3. Sistema Imune**

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

A imunidade natural, também chamada de imunidade inata ou nativa faz parte da linha de defesa inicial contra inúmeros microrganismos, consistindo em uma série de mecanismos de defesa celulares e bioquímicos pré-existentes antes do estabelecimento da infecção e são programados para responder de forma rápida aos patógenos. Essas respostas ocorrem da mesma maneira a repetidas infecções, sendo assim, são caracterizadas como respostas inespecíficas (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Os principais constituintes da imunidade inata são as barreiras físicas e químicas, como os epitélios, com sua superfície lipofílica impedindo a entrada de microrganismos; as secreções mucosas, impedindo a aderência de patógenos às superfícies epiteliais; as secreções corpóreas com atividade bactericida (lisozima e suco gástrico); o sistema complemento, citocinas e mediadores inflamatórios; além das células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos) e células *natural killer* (NK) (ROITT; DELVES, 2004).

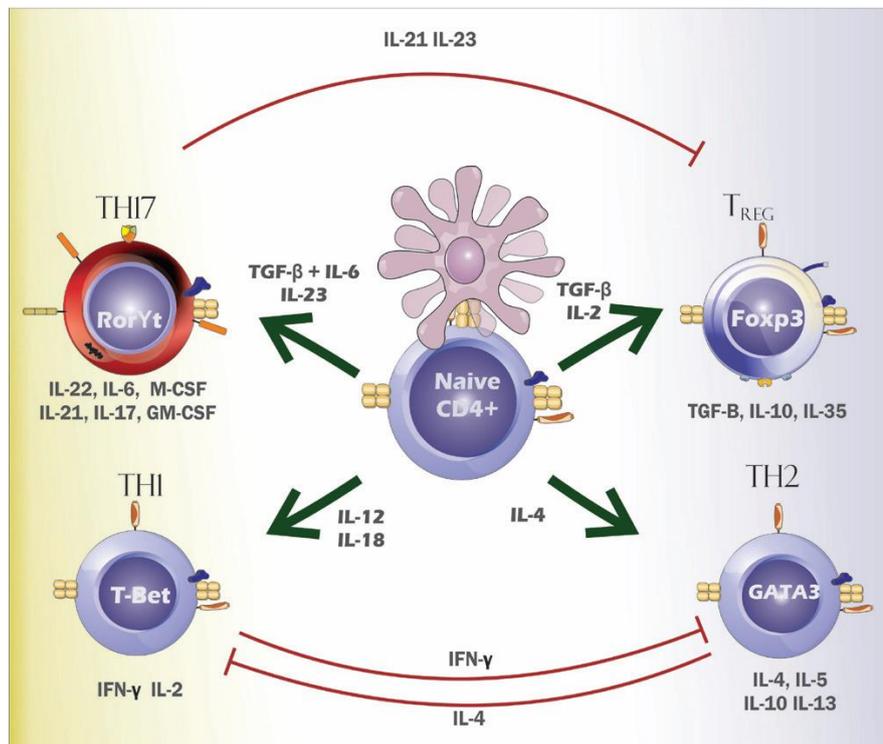
A imunidade adaptativa ou adquirida, ao contrário da inata, é estimulada pela exposição aos agentes infecciosos, desenvolvendo uma resposta específica para cada tipo de patógeno. Essa resposta específica tem início através do reconhecimento, pelos linfócitos (principal constituinte), dos antígenos estranhos, quando ativados, os linfócitos se proliferam e diferenciam em células efetoras com a função de eliminar o patógeno (SOUZA et al., 2010).

A imunidade adquirida possui dois tipos de resposta imune, a imunidade humoral que é mediada por anticorpos produzidos pelos linfócitos B (única célula capaz de produzir anticorpos) e a imunidade mediada por células que é desenvolvida pelos linfócitos T (ABBAS, et al., 2008).

Os Linfócitos T são os reguladores da resposta imune contra patógenos e células tumorais, participando como importantes efetores nos processos de alergia, rejeição de transplantes e autoimunidade. Apresentam dois tipos distintos de células, as células T auxiliares (CD4+) e as células T citotóxicas (CD8+). As CD4 reconhecem e se ligam ao antígeno apresentado pela molécula de MHC classe II, após a estimulação antigênica, os Linfócitos T CD4+ indiferenciados se proliferam e se diferenciam em diferentes subtipos efetores com características próprias (Th1, Th2, Th3, TREG, Th17), determinadas pelo perfil de citocinas produzidas e pelas propriedades funcionais (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Conforme esquematizado na Figura 1.4, as células Th1 caracterizam-se principalmente pela produção de grandes quantidades de INF- $\gamma$ , enquanto as células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-13. As respostas Th1 desencadeiam os mecanismos de hipersensibilidade tardia, ativam macrófagos e são muito eficientes na eliminação de

patógenos intracelulares. As células Th2 são mais eficientes em auxiliar a resposta imune humoral, desencadeando produção de imunoglobulinas e inflamação eosinofílica, respostas estas mais importantes no combate aos patógenos extracelulares (CRUVINEL et al., 2010).



**Figura 1.4:** Diferenciação das células CD4+ naive de acordo com o estímulo produzido com destaque para as citocinas indutoras da diferenciação Th1, Th2, Th17 e TREG e as principais citocinas secretadas. **Fonte:** Adaptado de Souza et al.,2010.

Estudos realizados em doenças autoimunes como artrite reumatoide, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), psoríase, esclerose múltipla, esclerose sistêmica, doença inflamatória intestinal, espondilite anquilosante e artrite idiopática juvenil demonstraram a presença de níveis elevados de produtos inflamatórios relacionados à via efetora Th17 ou mesmo a sua participação direta nos mecanismos fisiopatogênicos, mediando a inflamação tecidual precoce, produzindo citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pelo recrutamento de células Th1 aos sítios inflamatórios (SOUZA et al., 2010).

O sistema imune humano apresenta uma grande importância no combate às infecções, porém desregulações do sistema imune podem levar a inúmeras doenças, dentre elas estão as doenças autoimunes como o LES, doença celíaca, artrite reumatoide e o diabetes mellitus do tipo 1, em que nesses casos a desregulação ocorre no mecanismo de autotolerância (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008;).

O mecanismo de autotolerância é uma propriedade fundamental do sistema imunológico normal, pois atua na destruição ou inativação de linfócitos que reconhecem antígenos próprios. Essa capacidade é mantida nas células imunocompetentes B e T tanto por mecanismos centrais quanto por periféricos (SOUZA et al., 2010).

A perda da autotolerância pode ter causas intrínsecas ou extrínsecas. Causas intrínsecas, isto é, relacionadas a características do próprio indivíduo, estão em geral associadas a polimorfismos de moléculas de histocompatibilidade; componentes da imunidade inata como o Sistema Complemento e receptores *Toll-like*; componentes da imunidade adquirida como linfócitos com atividade regulatória e citocinas, além de fatores hormonais, que estão sob controle genético. Fatores ambientais como infecções bacterianas e virais, exposição a agentes físicos e químicos como UV, pesticidas e drogas são exemplos de causas extrínsecas. (SOUZA et al 2010).

As doenças autoimunes são caracterizadas por uma resposta inflamatória inapropriada e alterada, resultando no comprometimento de órgãos e tecidos, no qual o sistema imune falha em diferenciar o próprio do não-próprio (ZENEWIC et al., 2010). Essa alteração na resposta imune tem função significativa no desenvolvimento do LES, contribuindo com o dano aos tecidos, na via de liberação de citocinas inflamatórias, com a ativação descontrolada de células B e T, conduzindo no final a uma produção patogênica de autoanticorpos (CHOI ET AL., 2012).

As células B imaturas, que em condições normais, reconhecem e são ativadas contra auto-antígenos durante seu processo de maturação, são submetidas à seleção negativa pelos mecanismos de tolerância do sistema imune, evitando a presença de linfócitos B auto-reativos em órgãos do sistema imune periférico (YURASOV ET AL., 2006; KYTTARIS ET AL., 2010).

As LB funcionam como APCs na interação com células T, além de apresentar uma grande diversidade de funções regulatórias tanto na resposta imune quanto no LES. Apesar de mais comumente reconhecidas pela liberação de anticorpos as células B atuam na produção de citocinas e a interação direta com as células T e células dendríticas (CD), com impacto significativo na modulação da resposta imune. (MESQUITA JUNIOR et al, 2010).

As células B são eficientes na apresentação de antígenos, capazes de capturá-los através da superfície celular dos receptores de imunoglobulinas (Ig) para subsequente internalização, processamento e apresentação via moléculas de MHC de classe I ou II. A apresentação de peptídeos autoantígenos é capaz de ativar diretamente células T autoreativas. As LB podem ainda modular as células T de memória e regular o desenvolvimento e ativação de CDs (SINUANI et al., 2013).

Em condições normais, a produção de autoanticorpos é importante para a remoção de autoantígenos, liberados tanto por células em apoptose como em necrose. Contudo sua produção exacerbada e desregulada causa a formação de imunocomplexos, os quais se depositam nos tecidos e ativam o sistema complemento. Esses imunocomplexos, uma vez não removidos, podem desencadear a resposta inflamatória, causando o dano tecidual (KYTTARIS et al., 2010).

A compreensão destas vias de diferenciação e de seus desequilíbrios nas várias enfermidades autoimunes poderá ajudar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam a ampliar a ação das células reguladoras juntamente com o controle da resposta inflamatória efetora. No DM1, a desregulação desse mecanismo faz com que autoanticorpos reconheçam autoantígenos presentes nas células  $\beta$  produtoras de insulina, resultando na destruição das mesmas (SOUZA, *et al.*, 2010).

### 1.3.3.1 Citocinas

Dentre os componentes da imunidade inata as citocinas são polipeptídeos sinalizadores que regulam a função do sistema imune (ABBAS, *et al.*, 2008). São produzidas constitutivamente em muitos tipos diferentes de células, incluindo macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas vasculares, células dendríticas e células de Kupffer (ABBAS *et al.*, 2008).

Diferentes citocinas estimulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação. Na fase de ativação das respostas imunes adquiridas, as citocinas estimulam o crescimento e a diferenciação de linfócitos, e nas fases efetoras da imunidade inata e adquirida, elas ativam diferentes células efetoras para eliminar microrganismos e outros antígenos. As citocinas também estimulam o desenvolvimento de células hematopoiéticas e são muito importantes como agentes terapêuticos e como alvos para antagonistas específicos em numerosas doenças imunológicas e inflamatórias (NA; JUNG; KIM, 2014)

Interleucinas (IL) como a IL-1, IL-12, IL-10, IL-18, assim como fator de necrose tumoral, interferons tipo I e quimiocinas são exemplos de citocinas que medeiam e regulam a imunidade inata e agem mediando a resposta inflamatória, estimulando e regulando a migração de células, como neutrófilos e leucócitos, para os locais de infecção. Pesquisas recentes têm demonstrado que a subpopulação específica de linfócitos T CD4+ produtores de IL-17, mais do que células Th1, possui um papel central na patogênese de modelos experimentais de doenças autoimunes (MESQUITA JUNIOR et al., 2010).

Em contrapartida, a interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interferon-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e linfotoxinas são exemplos de citocinas que fazem parte da imunidade adquirida, medeiam a proliferação e a diferenciação de linfócitos após o reconhecimento do antígeno na fase de ativação das respostas imunes adquiridas, além da ativação de células efetoras especializadas (ABBAS *et al.*, 2008).

### 1.3.3.2 Interleucina 10 (IL-10)

A Interleucina 10 (IL-10) foi descrita pela primeira vez por Fiorentino em 1989, era denominada de Fator de Inibição da Síntese de Proteínas. Posteriormente, análises imunológicas e bioquímicas indicaram que era uma citocina, então passou a ser chamada de IL-10 (FIORENTINO ET AL 1989; MOORE ET AL 1990). Essa citocina é constituída por quatro cadeias polipeptídicas do tipo alfa-hélice, formando uma estrutura homodimérica covalentemente associada, sem carboidratos associados. Seu receptor possui duas subunidades: IL-10R1 e IL-10R2 (GREENHILL, et al., 2014).

A IL-10 é uma importante citocina imunoreguladora, pertencente ao grupo Th2, citocina produzida por quase todos os tipos celulares da imunidade inata e adaptativa (macrófagos, monócitos, células dendríticas, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, NK, CD4+, CD8+, LB). Sua produção é complexa, incluindo várias fases de regulação além de diferentes estímulos. Os homólogos virais de IL-10 pode ser produzido por vírus de Epstein-Barr, citomegalovírus e herpes vírus tipo 2 (ASADULLAH; STERRY; VOLK, 2003; GREENHILL et al., 2014).

Outras células não imunes, tais como células mesangiais, células epiteliais e queratinócitos também produzem IL-10 na resposta à infecção ou a lesão do tecido. Sua principal função biológica é exercida no controle das respostas inflamatórias e na regulação da proliferação e diferenciação de várias células imunitárias tais como células T, células B, células NK, células apresentadoras de antígenos, mastócitos e granulócitos. A IL-10 apresenta papel essencial no mecanismo homeostático, pois controla o grau e duração da inflamação (HUTCHINS; DIEZ; MIRANDA-SAAVEDRA, 2013).

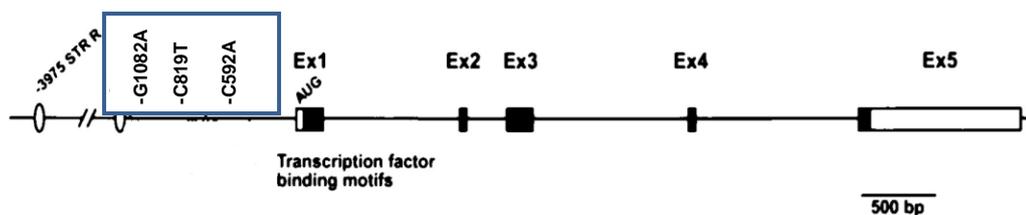
A IL-10 também é caracterizada como pleiotrópica, pois além de apresentar essa ação na regulação negativa nas respostas mediadas por células e na resposta inflamatória, sendo assim uma potente mediadora anti-inflamatória, pode também se comportar como uma citocina pró-inflamatória contribuindo para o quadro inflamatório característico do DM1, denominado insulite. É importante ressaltar que o grupo Th2 induz componentes da imunidade anti-células  $\beta$  através, principalmente, da ação promovida pela IL-10 (NG et al., 2013).

Investigações, incluindo análises de expressão em pacientes, em ensaios *in vitro* e em animais, sugerem um grande impacto da IL-10 em doenças inflamatórias, malignas, e autoimunes. Tem sido demonstrado que a IL-10 é um dos mais poderosos ativadores de linfócitos B, induzindo sua proliferação e uma intensa produção de imunoglobulinas (LYER; CHENG, 2012; PENG et al., 2013).

Ademais, a IL-10 pode prolongar a sobrevivência de linfócitos B mediante a indução da produção de bcl-2 pelos próprios linfócitos B, protegendo-os assim da apoptose. A desregulação do gene *IL-10* é uma característica frequente na artrite reumatóide, síndrome de Sjögren e LES. A desregulação desse gene ocorre tanto em linfócitos B como em monócitos e seu papel no estímulo inapropriado de linfócitos B resultaria de vias autócrinas e parácrinas (RICHAUD-PATIN et al., 1997). A produção de autoanticorpos é uma das principais características dos pacientes com DM1, sendo essa desordem também caracterizada por uma alteração na regulação de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias. Alguns estudos têm sugerido que 75% da variação na produção de IL-10 seja geneticamente determinada ((MOHEBBATIKALJAHİ et al., 2009; WANG et al., 2013).

#### **1.3.4 Gene *IL10***

O gene *IL10* humano abrange cerca de 4,7 kb no cromossomo 1q32.2 (Figura 1.5) e contém cinco exons e 4 introns, apresenta vários sítios polimórficos dentro da região promotora, incluindo dois microssatélites e três polimorfismos de base única (SNPs) nas posições -G1082A (rs1800896), -C819T (rs1800871) e -C592A (rs1800872), antes do início do sítio de transcrição. Assim, as diferenças interindividuais na produção desta citocina estão relacionadas a estes polimorfismos (TURNNER, 1997; PIGOSSI et al., 2012). A produção é controlada no nível da transcrição e algumas variações podem ser explicadas por dois polimorfismos de microssatélites (IL-10G e IL-10R) na região promotora (HARTSTEIN; MACHADO, 2014).



**Figura 1.5:** Representação do Gene *IL10* localizado no cromossomo 1q31-32. Observe os exons, região promotora e SNPs. **Fonte:** Adaptado de Shin et al, 2000.

É importante ressaltar que a identidade de sequência e localização de transcrição de sítios de ligação são bem conservadas entre as espécies, o que sugere que os mecanismos da regulação e da transcrição são semelhantes. O promotor proximal de *IL-10* em seres humanos é caracterizados por uma caixa TATA ~ 90 pb a montante do local de início da tradução e uma caixa CCAAT situado em -237 pb a montante do local de início da tradução (LYER; CHENG, 2012).

#### 1.3.4.1 Polimorfismos Genéticos e IL-10

Os polimorfismos única base (SNPs) são alterações de um único nucleotídeo que ocorrem em uma frequência maior que 1% na população. Acredita-se que os SNPs possam ser a verdadeira fonte da variabilidade entre os seres humanos, especialmente quando se encontram em regiões codificantes do DNA. ( LINDSAY; HODGSON, 2001; CARLTON et al, 2006).

Essas mutações pontuais podem formar haplótipos que caracterizam-se por serem combinações de alelos em loci diferentes no mesmo cromossomo que são herdados juntos (LEWIN, 1997).

Os SNPs podem também estar situados em regiões reguladoras ou promotoras do gene, e podem alterar a ligação dos fatores de transcrição e a quantidade de proteína produzida. Apesar das regiões intrônicas não serem codificantes, SNPs nessas regiões podem apresentar desequilíbrio de ligação com outros em regiões codificantes, tornando-se informativo para associação com doenças (KIM; MISRA, 2007). O desequilíbrio de ligação descreve uma situação em que algumas combinações de alelos ou marcadores genéticos ocorrem mais ou menos frequentemente numa população do que era esperado pela formação aleatória de haplótipos a partir de alelos baseados nas suas frequências. Através do grau de desequilíbrio de ligação são medidas as associações não-aleatórias entre polimorfismos em *loci* diferentes (LEWIN, 1997).

Com ampla distribuição no genoma, os SNPs são facilmente identificados, podendo constituir marcadores para estudos de associação. Isto pode ser observado pelo número de SNPs que vem sendo associados a doenças complexas, como as infecciosas e as autoimunes (GIBBS; SINGLETON, 2006; CARLTON et al., 2006).

A presença de um polimorfismo pode implicar em mudança no código genético, que é a relação entre a sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA) e a sequência da proteína correspondente, alterações no genótipo (sequência de bases), afeta ou não a proteína, que determinará a mudança no fenótipo. (LANDER, 2011).

Os SNPs podem ter papéis importantes na função gênica, podendo alterar substancialmente os níveis da expressão proteica, substituir aminoácidos ou até truncar proteínas, caso ocorram em regiões codificantes (CARLTON et al., 2006). Essas alterações dependerão da localização do SNP ao longo do genoma humano, já que eles podem ser encontrados em regiões não codificantes ou, apenas, ocasionando mudanças sinônimas (KIM; MISRA, 2007).

Nos últimos anos, grandes esforços estão sendo realizados no que concerne à identificação dessas variações genéticas humanas e sua correlação com as doenças complexas. Muitos SNPs já foram avaliados em estudos genômicos de associação com muitas doenças importantes, como as doenças autoimunes (BUCHANAN et al., 2012). Embora esses estudos tenham proporcionado novos conhecimentos biológicos, somente uma quantidade limitada do componente hereditário de qualquer característica complexa foi identificado (LANDER, 2011). Por essa razão, o papel de polimorfismos na susceptibilidade a infecções e doenças continua sendo amplamente investigado (ZHU et al, 2013).

A partir de estudos genéticos de doenças autoimunes e inflamatórias, uma constatação clara, proveniente de estudos de associação de SNPs do genoma, é que uma fração substancial de uma variação de risco em uma determinada doença também contribui para mediar o risco para várias outras doenças adicionais autoimunes e inflamatórias (RICHARD-MICELI; CRISWELL, 2012; VOIGHT; COTSAPAS, 2012). Portanto, os SNPs representam a maior fonte de variações interindividuais genéticas que podem ser utilizados para identificar as contribuições poligênicas em determinadas doenças, funcionando como uma extraordinária ferramenta na análise de marcadores genéticos, devido à sua abundância (GIBBS; SINGLETON, 2006).

A *IL-10* pode influenciar tanto a susceptibilidade e o curso de várias doenças, e os diferentes polimorfismos no promotor do gene *IL-10* têm sido associados com prevalência e gravidade das doenças. Três SNPs em particular têm sido relatados por desempenhar um papel importante na regulação do *IL-10*. Estes SNPs são situados

nas posições -A1082G, -C819T, -A592C e estão localizados na região promotora, estando em desequilíbrio de ligação e, portanto, sendo herdados juntos (URCELAY et al., 2004; REYNIER et al., 2006; ZHANG, A. et al., 2014)

São formados oito possíveis haplótipos; GCC, GCA, GTC, GTA, ACC, ACA, ACT E ATA. Destes apenas três haplótipos são comuns em indivíduos da raça caucasiana: GCC, ACC e ATA; GTA é mais comum no sul da China. O genótipo GCC/GCC é mais comum naqueles que produzem maiores níveis de IL-10, enquanto o genótipo ATA / ATA predomina em baixos produtores de IL-10.(ZHANG, L. et al., 2014)

É difícil relacionar o genótipo da IL-10 com a sua expressão pois seus haplótipos variam entre grupos étnicos. Por exemplo, a frequência de GCC em posições -1082, -819, -592 está acima de 50% em caucasianos, contudo abaixo de 5% em populações asiáticas. Muito provavelmente, combinações de diferentes polimorfismos em haplótipos, em vez de SNPs individuais ou microssatélites, contribuem para a variabilidade na produção de IL-10 e da resposta à infecção ou doença etiológica autoimune (LYER; CHENG, 2012).

Os genes das citocinas tradicionalmente têm atraído grande interesse como plausíveis fatores de risco genético para a doença autoimune. Devido à produção de citocinas ser regulada geneticamente, foi levantada a hipótese de que SNPs em genes das citocinas podem ser relevantes para o desenvolvimento de autoimunidade. Dessa forma, o gene *IL10* é considerado um candidato provável na patogênese do DM1 (PARADOWSKA et al.,2010).

## CAPÍTULO 2

### ASSOCIAÇÃO ENTRE INTERLEUCINA-10 E DIABETES MELLITUS TIPO 1 EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Gláucia Allyne Nunes de Lacerda<sup>1</sup>, Nathália de Alencar Cunha Tavares<sup>3,§</sup>, Anna Paula Oliveira<sup>3</sup>, Jaqueline de Azevêdo Silva<sup>3</sup>, Jacqueline Araújo<sup>4</sup>, Lucas André Cavalcanti Brandão<sup>3,5</sup>, Sergio Crovella<sup>2,3</sup> and Rafael Lima Guimarães<sup>1,2,3</sup>

1. Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil;
2. Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil;
3. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil;
4. Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil;
5. Departamento de Patologia , Universidade Federal de Pernambuco –UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil;

§ Correspondência para o autor:

Gláucia Alyne Nunes de Lacerda

e-mail: glaucia.alacerda@yahoo.com.br

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE

Av. Moraes Rego, 1235, Recife/ Brasil, Código de Endereçamento Postal (CEP):

50760-901

Telefone / Fax 55 81 21268484

**Será submetido na revista:** Cytokine Journal

**Fator de Impacto:** 2.87

## 2.1 Resumo

O diabetes tipo 1 (DM1) é uma doença multifatorial, caracterizada pela destruição autoimune de células  $\beta$  produtoras de insulina através da infiltração de linfócitos T autorreativos no pâncreas. O mecanismo de patogenicidade desta doença não é completamente esclarecido. Sabe-se que a susceptibilidade genética desempenha um papel importante na patogênese. Várias regiões não-Antígeno Leucocitário Humano (HLA) são descritos como sendo importante para o desenvolvimento da doença, estão sendo realizados estudos de genes nesta região, especialmente os que estão envolvidos com o sistema imunitário. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a associação de polimorfismos de única base (SNPs) do gene *IL-10*, bem como os seus níveis de expressão, com o desenvolvimento de DM1 e outras doenças autoimunes (Doença Celíaca e Tireoidite Autoimune) e correlacionar com início de DM1 na população pernambucana brasileira. Os SNPs estudados foram -A1082G (rs1800896), -C819T (rs1800871) e -A592C (rs1800872). A genotipagem dos SNPs e a expressão gênica foram realizados através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando sondas TaqMan. O gene *IL10* foi mais expresso em pacientes DM1 quando comparados aos controles (p-valor 0,02). E estava quatro vezes mais expresso no grupo com a idade de diagnóstico do DM1 (p-valor 0,04). Verificou-se uma associação de rs1800871 com a idade no momento do diagnóstico (p-valor 0,02). Não houve associação dos SNPs com a susceptibilidade à DM1, ou o DM1 associada a AITD e DC. Não houve diferença estatística em relação ao sexo e idade com as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas entre pacientes e controles. Assim, este estudo sugere que a *IL-10* está envolvida na patogênese do DM1 e poderá ser um biomarcador para o risco de DM1 na população pernambucana.

**Palavras-Chaves:** Expressão. Gene *IL10*. Idade de diagnóstico. SNP.

## 2.2 Abstract

Type 1 diabetes (T1D) is a multifactorial disease resulting from the interaction of genetic and environmental factors. This disease is characterized by autoimmune destruction of pancreatic insulin-producing  $\beta$  cells, with presence of auto reactive antibodies. The pathogenic mechanism of this disorder is not completely understood. But, it is known that the genetic susceptibility plays an important role in the pathogenesis. Several non-HLA regions are described as being important for the development of the disease, and studies of genes in this region, especially having effect on the immune system, is being conducted. Thus, this study aimed to evaluate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of Interleukin 10 (*IL10*) gene, as well as its expression levels, with the development of T1D and other autoimmune diseases (celiac and autoimmune thyroiditis) and correlate with onset of T1D in a population of Brazilian northeast. The *IL10* SNPs studied were rs1800896, rs1800871 and rs1800872; all are functional and located in the promoter region of the gene. The assay genotyping of SNPs and gene expression was carried out by polymerase chain reaction (PCR) in real time, using TaqMan probes. The *IL10* gene was upregulated in T1D patients compared to controls (p-value 0.02). The same was observed in the group with higher age of T1D onset (p-value 0.04). Regarding to SNPs genotyping, it was found an association of rs1800871 with age at diagnosis (p-value 0.02). There was no association of SNPs with susceptibility to T1D, or the T1D associated with AITD and DC. No statistical differences regarding to gender and age with alleles, genotypes and haplotypes frequencies, between patients and controls. Thus, this study suggests the involvement of IL10 in the pathogenesis of the disease, contributing to the discovery of biomarkers for risk of T1D in our population.

**Key words:** Expression. Gene *IL10*. Onset T1D. SNPs.

## 2.3 Introdução

Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela destruição das células  $\beta$  pancreáticas através da infiltração de células, principalmente linfócitos T autorreativos, que reagem contra antígenos nestas células. Como em todas as doenças autoimunes, a suscetibilidade genética e fatores ambientais são importantes na sua patogênese. Há evidências de que fatores ambientais, principalmente patógenos, estão envolvidos no desencadeamento de autoimunidade na diabetes tipo 1 (NOKOFF; REWERS, 2013).

A idade de surgimento de diabetes do tipo 1 é muito variável e está geneticamente modulada (IDE et al., 2002). Apesar de ser uma doença comum da infância e adolescência, os adultos também podem desenvolver DM1. A taxa de incidência de DM1 está crescendo em todas as faixas etárias em torno de 3% ao ano, com o maior aumento entre as crianças com menos de 5 anos. A causa desse aumento na incidência da doença é desconhecida, acredita-se que está relacionado aos fatores ambientais (SIMMONS; MICHELS, 2014).

Estudos mostraram que o processo de destruição de células- $\beta$  é mais agressivo em crianças com diabetes de início precoce do que em pacientes diagnosticados em idade mais avançada. Entender as diferenças de atividade do sistema imunológico nas crianças diabéticas abriria o caminho para identificar precocemente os indivíduos com risco de DM1 e a utilização de novas formas de intervenção (SZYPOWSKA et al., 2012).

Na patogênese da DM1, citocinas e outros reguladores da resposta imune têm papéis importantes. A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina pleiotrópica, atuando como um potente mediador anti-inflamatório através da inibição da resposta imunológica celular. Como também pode promover a inflamação em várias doenças autoimunes, através da ativação da imunidade humoral, aumentando a produção de anticorpos e o processo inflamatório.(REYNIER et al., 2006).

O gene *IL10* está localizado no cromossoma 1 e apresenta três principais SNPs funcionais na sua região promotora: -A1082G(rs1800896), -C819T (rs1800871), -A592C (rs1800872). Essas variações podem controlar a transcrição e afetar IL-10 nível de produção (WANG et al, 2012; NA et al, 2014, PUBMED, 2014). Esses SNPs estão associados com a susceptibilidade de algumas doenças autoimunes, tais como artrite reumatóide, psoríase e lúpus eritematoso sistêmico (LES) e DM1 (Zhu et al., 2013). Na insulite, quadro inflamatório característico do DM1, é importante ressaltar que o grupo Th2 induz componentes da imunidade anti-células  $\beta$  através,

principalmente, da ação promovida pela IL-10 (NG et al., 2013; SINVANI et al., 2013; SAXENA et al, 2014).

Diferenças interindividuais nos níveis de IL-10 foram destacadas. As frequências alélicas e genótípicas dos SNPs apresentam diferentes distribuições de acordo com a etnia (URCELAY et al, 2004; MOHEBBATIKALJAHÍ et al, 2009).

Novos estudos são necessários para esclarecer o papel da IL-10 no DM1, pois a busca por marcadores de suscetibilidade genética associada à doença mostra-se relevante, na medida em que podem indicar grupos de risco e permitir intervenção precoce, minimizando ou evitando os prejuízos causados pela doença. Assim, foi hipotetizado que o aumento na expressão da IL-10 acelera o processo de insulite e este aumento está associado à presença dos SNPs

O objetivo deste estudo é avaliar a associação entre três polimorfismos (-A1082G, -C819T, -A592C), localizados na região promotora do gene *IL10* e a susceptibilidade ao DM1, relacionando com o surgimento de doença celíaca e tireoidite autoimune, com a idade do diagnóstico e os níveis de expressão dessa citocina em uma população pernambucana.

## 2.4 Material e Métodos

### 2.4.1 Estudo de Genotipagem

#### 2.4.1.1 Pacientes e Indivíduos Saudáveis

Estudo do tipo caso-controle, realizado no período de Março de 2010 a Dezembro de 2013.

Os pacientes DM1 foram provenientes dos três maiores centros do Sistema Único de Saúde (SUS) de referência em Endocrinologia Pediátrica, localizados em Recife, Brasil (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Hospital da Restauração e Hospital das Clínicas – UFPE). O diagnóstico do DM1 foi realizado de acordo com os critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA, 2014).

Os indivíduos saudáveis eram doadores de sangue do Hemocentro de Pernambuco (HEMOPE) e não apresentavam sinais clínicos ou história familiar de DM1 ou outras doenças autoimunes.

Ambos os pacientes e indivíduos saudáveis aceitaram participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do IMIP, número 1717/2010.

A amostra foi composta por 287 pacientes DM1 (média de idade de 12.8 anos) e 295 indivíduos saudáveis (média de idade de 32.2 anos) compondo o grupo de controles (HC). Pacientes DM1 e Indivíduos saudáveis eram nascidos e viviam na mesma região geográfica de Pernambuco.

Os pacientes foram estratificados de acordo com a insurgência de tireoidite autoimune (AITD) e doença celíaca (DC). Baseado nisso, foram formados três subgrupos: DM1/AITD (AITD+DC-), DM1/DC (AITD-DC+) e DM1/AITD/DC (AITD+DC+).

#### 2.4.1.2 Coleta de Dados

Através dos prontuários dos pacientes foram obtidas informações clínicas como: sexo, idade, história familiar de doenças autoimunes, diagnóstico de Síndrome Poliglandular, idade de diagnóstico, comorbidades, complicações, presença Anticorpo Anti-insulina (IAA), Anticorpo Anti-ilhota pancreática (ICA), Anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD), anti-transglutaminase (AtTG) e antitireoperoxidase (ATPO) e diagnóstico de tireoidite autoimune e doença celíaca.

#### 2.4.1.3 Seleção dos SNPs e genotipagem do gene *IL10*

O DNA genômico foi isolado através de sangue periférico total usando o protocolo de Salting-out (SAMBROOK; FRITCH; MANIATIS T, 1989).

Os SNPs, -A1082G (rs1800896), -C819T (rs1800871) e -A592C (rs1800872), localizados na região promotora do gene *IL10* foram genotipados seguindo as orientações do fabricante, através de Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR), usando sondas alelos específicas, sondas Taqman (C\_1747362\_10, C\_1747363\_10 and C\_1747360\_10) (Taqman Probes, Applied Biosystems, Foster City, CA). As amplificações, leituras das fluorescências e subseqüentes análises foram realizadas pela plataforma 7500 Real Time PCR Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### 2.4.1.4 Análises Estatísticas

As freqüências genotípicas, alélicas e haplotípicas foram calculadas utilizando a ferramenta SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). O teste exato de Fisher foi aplicado para avaliar a significância estatística para todas as comparações. Verificou-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os SNPs utilizando o software Genótipo Transposer. O software Haploview foi utilizado para investigar o padrão de desequilíbrio de ligação bem como para derivar os haplótipos. O SNPstats também foi utilizado para verificar a associação dos SNPs com o DM1.

O pacote "SNPassoc" do R (software R, versão 2.12.2), desenvolvido para estudos genéticos, foi utilizado para avaliar a associação entre SNPs e idade de início (GONZÁLEZ et al., 2007). Odds Ratio (OR) e 95% de intervalos de confiança (IC) também foram calculados. A análise do poder estatístico foi realizada com o software "G \* power" (versão 3.1), com um p-value significativo menor que 0.05.

### **2.4.2 Ensaio de Expressão do gene *IL10***

#### 2.4.2.1 Amostra

Os níveis de expressão do gene *IL10* foram avaliados em 17 pacientes DM1 e 19 indivíduos saudáveis (HC), procedentes do estado de Pernambuco-Brasil. Os HC não tinham história familiar e diagnóstico de DM1 e outras doenças autoimunes.

Os pacientes foram previamente genotipados para os SNPs (rs1800896, rs1800871 e rs1800872) e foram divididos em três grupos de acordo com a idade de diagnóstico, observando critérios de classificação do Ministério da Saúde (MS) e do

Estatuto da Criança e do Adolescente (ECA) de acordo com as fases de desenvolvimento.

O grupo A é composto por crianças de 0 a 6 anos, classificadas como primeira e segunda infância. O grupo B por crianças de 7 a 11 anos, classificadas como terceira infância e o grupo C acima de 12 anos, são os adolescentes.

#### 2.4.2.2 Extração do RNA

Amostras de sangue periférico foram coletadas e imediatamente utilizadas para o isolamento de RNA, através do protocolo de isolamento de RNA por Trizol (CHOMCZYNSKI; MACKEY, 1995). O RNA foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até à sua utilização, a quantificação foi realizada usando o Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) e sua integridade foi comprovada através de eletroforese em gel de agarose a 1%.

#### 2.4.2.3 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada através de Kit específico da Invitrogen, EUA utilizando as recomendações do fabricante. O cDNA foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios de qPCR.

#### 2.4.2.4 Análise do Ensaio de Expressão Gênica

O gene alvo foi o gene *IL10* (Hs00961622\_m1) e o controle endógeno foi B-actina (ACTB - Hs99999903\_M1). Eles foram amplificados com os ensaios específicos de sondas TaqMan para expressão, conforme as recomendações do fabricante (Applied Biosystems, EUA) e utilizando a plataforma SDS ABI 7500 (Applied Biosystems, EUA).

A expressão quantitativa relativa foi calculada como Diferença de Expressão (FC), seguindo as indicações de Schmittgen; Livak, 2008. Valores de expressão relativa apresentados são baseados em triplicatas. O teste T de Student foi aplicado como pós-teste para comparar diferentes grupos.

## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Estudo de Genotipagem

As frequências genotípicas e alélicas nos grupos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto para o rs1800872. A Tabela 2.1 apresenta a distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do gene *IL10* em pacientes DM1, indivíduos saudáveis e subgrupos compostos de Pacientes DM1 associado a tireoidite autoimune e doença celíaca.

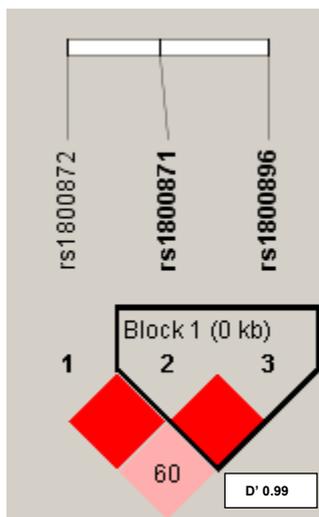
Não foram encontradas diferenças estatísticas na distribuição das frequências alélicas e genóticas dos SNPs entre os grupos analisados de pacientes com DM1, DC e AITD e indivíduos saudáveis, com valor- $p > 0,05$  em todos os modelos genéticos.

**Tabela 2.1:** Distribuição das frequências alélicas e genóticas nos pacientes DM1, controles e subgrupos: AITD e DC.

SNPs	DM1	HC	DM1	DM1	DM1
	N= 287	N= 295	AITD+DC-	AITD+DC+	AITD-DC+
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
<b>-A1082G (rs1800896)</b>			<b>41 (14,96)</b>	<b>3 (1.09)</b>	<b>9 (3.28)</b>
A	357 (63)	357 (65)	51 (69)	6 (100)	11 (69)
G	211 (37)	193 (35)	23 (31)	0 (0)	5 (31)
<b>Genótipos</b>					
A/A	108 (38)	112 (41)	16 (43)	3 (100)	3 (38)
A/G	141 (50)	133 (48)	19 (51)	0 (0)	5 (63)
G/G	35 (12)	30 (11)	2 (5)	0 (0)	0 (0)
<b>-C819T (rs1800871)</b>					
C	357 (68)	333 (65)	48 (65)	2 (33)	11 (61)
T	167 (32)	181 (35)	26 (35)	4 (67)	7 (39)
<b>Genótipos</b>					
C/C	119 (45)	102 (40)	13 (35)	0 (0)	3 (33)
C/T	119 (45)	129 (50)	22 (59)	2 (67)	5 (56)
T/T	24 (9)	26 (10)	2 (5)	1 (33)	1 (11)
<b>-A592C (rs1800872)</b>					
A	283 (54)	283 (55)	39 (53)	4 (67)	10 (56)
C	241 (46)	231 (45)	35 (47)	2 (33)	8 (44)
<b>Genótipos</b>					
A/A	26 (10)	27 (11)	2 (5)	1 (33)	1 (11)
A/C	231 (88)	229 (89)	35 (95)	2 (67)	8 (89)
C/C	5 (2)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

O SNP –C819T (rs1800871) foi associado com a idade de diagnóstico do DM1, (p-valor: 0,025; AIC: 1351, idade média de 8,036 anos) Esta associação mostra que existe diferenças entre os grupos e os indivíduos que possuem os genótipos C / T e T / T poderiam desenvolver a doença mais tarde quando comparados C / C. Nenhuma associação estatística da distribuição de sexo foi obtida para todos os loci ( $p > 0,05$ ).

Uma vez que estes SNPs podem atuar em combinação para aumentar o risco de doença, os haplótipos formados pelos SNPs foram investigados quanto à associação com o DM1, como também a distribuição de suas frequências em pacientes e grupo controle foi comparada. O desequilíbrio de ligação (LD) entre SNPs também foi medido. Os SNPs testados mostraram estar em forte desequilíbrio de ligação ( $D' = 0,99$ ) (Figura 2.1).



**Figura 2.1:** Representação do bloco de haplótipos formados pelos três SNP, mostrando o desequilíbrio de ligação entre eles, com um  $D'=0.99$  entre o rs1800871 e rs1800872.

Cinco haplótipos foram encontrados na população pernambucana, como demonstrado na Tabela 2.2. Os haplótipos ATA, GCC e ACC representam aproximadamente 80% de todos os haplótipos encontrados. Nenhuma associação foi observada dos haplótipos com a suscetibilidade de desenvolver DM1.

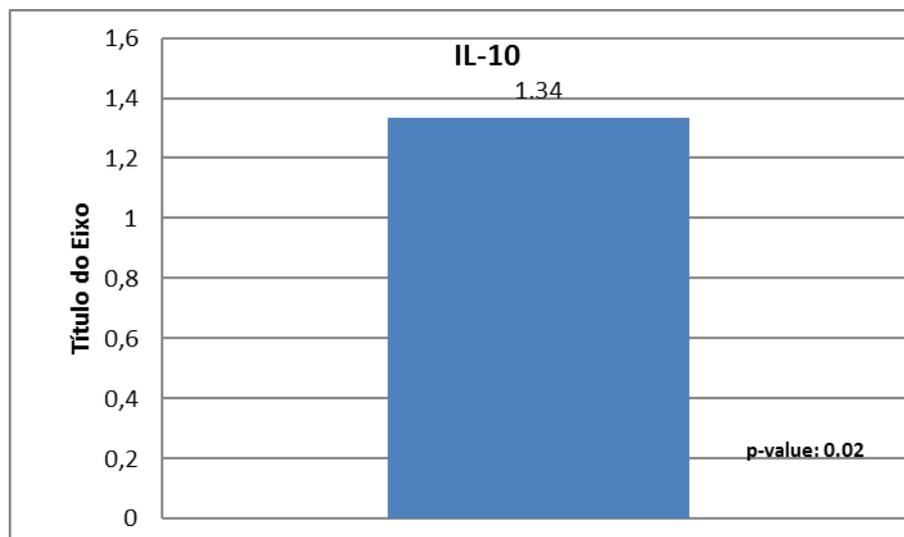
**Tabela 2.2:** Distribuição das frequências haplotípicas nos pacientes e controles e a associação dos haplótipos com DM1

Haplotypes	rs1800896 (A/G)	rs1800871 (C/T)	rs1800872 (A/C)	DM1 (%)	HC (%)	p-value	OR	IC 95%
I	A	T	A	35	32	-	1.0	-
II	G	C	C	26	25	0.76	0.91	0.51- 1.63
III	A	C	C	18	20	0.44	0.78	0.42- 1.45
IV	A	C	A	12	9	0.75	1.10	0.63 - 1.92
V	G	C	A	8	12	0.12	0.64	0.36 - 1.13

**Global association p-value:0.57**

## 2.5.2 Ensaio de Expressão Gênica

O gene *IL10* apresenta um aumento na expressão de 1,34 vezes (p-value: 0,02) nos pacientes DM1 quando comparados aos controles (os quais foram normalizados para 1), conforme representado na Figura 2.2



**Figura 2.2:** Níveis de expressão de *IL-10* nos pacientes DM1 comparados com os controles, os quais foram normalizados para 1.

Verificou-se que o gene *IL10* está 4,3 vezes mais expresso no grupo de pacientes DM1 na faixa etária de 7 a 11 anos, quando comparado aos outros grupos, com p-value de 0,04, conforme apresentado na Tabela 2.3. Esta faixa de idade corresponde à média de idade de diagnóstico da população pernambucana estudada.

**Tabela 2.3:** Expressão de mRNA do gene *IL10* em pacientes DM1 estratificados por idade de diagnóstico do DM1.

Pacientes DM1, agrupados em faixa etária de acordo com a idade de diagnóstico	Diferença de Expressão(FC)	p-value
Comparação entre os grupos A e B	0.325352	0.15
Comparação entre os grupos A e C	1.39781	0.46
Comparação entre os grupos B e C	4.296304	0.04

**Legenda:** Grupo A: 0 a 6 anos de idade; Grupo B: crianças de 7 a 11 anos de idade; Grupo C: adolescentes com idade maior que 11 anos

## 2.6 Discussão

Como já descrito, no DM1 a destruição das células  $\beta$  pancreáticas ocorre pela insulite, processo inflamatório característico da doença com infiltração de linfócitos T autorreativos e presença de autoanticorpos. O gatilho inicial para o desenvolvimento da insulite não é conhecido, sabe-se que o DM1 é uma doença poligênica com componente genético muito forte. Vários genes não-HLA foram descritos como possíveis candidatos para o desenvolvimento da doença, principalmente os do sistema imune (BAKAY; PANDEY; HAKONARSON, 2014).

Neste trabalho, a expressão da IL10 está aumentada em relação ao controles e superexpressa na média de idade de diagnóstico da doença, este dado evidencia a ação inflamatória da IL-10 no DM1.

Dados na literatura mostram que outros estudos também relataram a participação da IL-10 na insulite. Wongensen, Lee, Sarvetnick (1994), Lee et al (1996) e Moritane et al (1996) realizando estudos com ratos, observaram que o agravamento da insulite estava associado ao aumento na produção de IL10. Ng et al. (2013), Sinvani et al. (2013) e Saxenna et al(2014) descrevem que na patogênese do DM1, o grupo Th2 induz componentes da imunidade anti-células  $\beta$  através, principalmente, da ação promovida pela IL-10.

Estudos realizados em ratos também sugeriram que o agravamento do processo de insulite estava associado ao aumento na produção de IL10 (WONGENSEN; LEE, SARVETNICK, 1994; LEE et al 1994, 1996; MORITANE et al, 1996). Lyer e Cheng (2012) mostram que houve uma diminuição da produção de autoanticorpos em um estudo in vitro de depleção de IL10 com anti-anticorpo IL10 em pacientes de Lupus Eritematoso Sistêmico (LES).

Saxena et al (2014) relataram a necessidade de estudos para compreensão do papel da IL10 no DM1 devido aos resultados contraditórios na literatura. Como também que estudos experimentais em ratos utilizando o papel anti-inflamatório da IL10 produziram efeitos contraditórios e amplamente irrelevantes.

Esses fatos podem ser explicados por Sinuani et al (2013) que informam sobre o paradoxo da IL10 considerando que em determinadas condições o aumento da IL10 gera um efeito protetor e em outras agravante. Além disso, é importante notar que os efeitos biológicos da expressão de IL10 são altamente contextuais. Por isso para entender a regulação gênica é preciso considerar o local de produção, a

especificidade do tecido, o tipo de estímulo e a variação genética individual (LYER; CHENG, 2012).

Outro resultado importante deste estudo foi associação encontrada do rs1800871 com diagnóstico tardio, sugerindo uma possível função protetora desse SNP, esse dado corrobora com os achados de Akane et al (2002) na população japonesa. Neste estudo não houve associação dos SNPs com os níveis de expressão da IL10 apesar desses SNPs estarem relacionados a alterações na produção dessa citocina.

Na população pernambucana não houve associação do SNps com a susceptibilidade ao DM1, nem ao surgimento de AITD e DC. Assim como nas populações espanhola, francesa, turca, japonesa. (TEGOSHI et al., em 2002, HASSAN et al, (2009); URCELAY et al, 2004; REYNER et al, 2006). Também não houve associação do SNps com os níveis de expressão da IL10, inferindo que não estão associados com a patogênese da doença.

## **2.7 Conclusão**

A partir deste estudo e de dados da literatura é possível inferir que o gene da IL-10 é um forte candidato na patogênese do T1D e propor que o aumento na síntese de IL10 pode provocar um aumento na hiperatividade dos LB aumentando a produção e deposição de imunocomplexos, agravando o processo de insulite.

Como havia sido hipotetizado, a IL-10 está associada ao desenvolvimento T1D, na população pernambucana, atuando como citocina inflamatória, contudo esta ação não é através dos SNPs estudados.

Assim surge a necessidade de continuar investigando o mecanismo de participação da IL10 no desenvolvimento do DM1 como biomarcadores de diagnóstico precoce e prognóstico para desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

## **FINANCIAMENTO**

Este trabalho foi financiado pelas agências de fomento brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE)

## CONFLITE DE INTERESSE

Nenhum dos autores tem qualquer conflito de interesse financeiro relacionado a este manuscrito.

## 2.8 Referências

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 37Suppl 1:S81-S90, Jan 2014 245–248, 2009.

BAKAY, M.; PANDEY, R.; HAKONARSON, H. Genes involved in Type 1 Diabetes: An Update. **Genes**, v.4, p. 499-521, 2013.

CHOMCZYNSKI; MACKEY. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. **Biotechniques**,19(6):942-5. 1995.

GONZÁLEZ, J. R.; ARMENGOL, L.; SOLÉ, X.; et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 5, p. 644–5, 2007.

IDE, A.; KAWASAKI, E.; ABIRU, N.; et al. Genetic association between interleukin-10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-at-onset. **Human Immunology**, v. 63, n. 8, p. 690–695, 2002.

LEE, M. S, MUELLER, R, WICKER, L. S, PETERSON, L. B, SARVETNICK, N. IL-10 is necessary and sufficient for autoimmune diabetes in conjunction with NOD MHC homozygosity. **J Exp Med** 183:2663, 1996.

LYER; CHENG, 2012. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Crit Rev Immunol**, 32(1): 23–6, 2012.

MOHEBBATIKALJAH, H.; MENEVSE, S.; YETKIN, I.; DEMIRCI, H. Study of interleukin-10 promoter region polymorphisms (–1082A/G, –819T/C and –592A/C) in type 1 diabetes mellitus in Turkish population. **Journal of Genetics**, v. 88, n. 2, p.

MORITANI, M.; YOSHIMOTO, K.; TASHIRO, F.; HASHIMOTO, C.; MIYAZAKI, J.; II S, KUDO.; E, IWAHANA.; H, HAYASHI.; Y, SANO. T. Transgenic expression of IL-10 in pancreatic islet A cells accelerates autoimmune insulinitis and diabetes in non- obese diabetic mice. **Int Immunol**, v. 6:1927, 1994.

NA, K. S.; JUNG, H. Y.; KIM, Y. K. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 48, p. 277–286, 2014.

NG, T.H.S. et al., Interleukin-10 regulates adaptive immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 4, artigo 129, maio, 2013.

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, 2013.

PAKALA, S.V; KURRER, M.O.; KATZ, J.D. T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-com-promised nonobese diabetic (NOD) mice. **J Exp Med** 186:299, 1997.

PENNLIN, K.J; ROQUE-GAFFNEY, E; MONAHAN, M. Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 71(2):169–75,1994.

REYNIER, F.; CAZALIS, M.-A.; LECOQ, A.; et al. Lack of association of IL-10 promoter gene variants with type 1 diabetes in a French population. **Human immunology**, v. 67, n. 4-5, p. 311–7, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning - **A laboratory Manual**. 2 ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

SAXENA, A.; KHOSRAVIANI, S.; NOEL, S.; et al. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. **Cytokine**, 2014

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SIMMONS, K.; MICHELS, A. W. Lessons from Type 1 Diabetes for Understanding Natural History and Prevention of Autoimmune Disease. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 40, n. 4, p. 797–811, 2014.

SINUANI, I.; BEBERASHVILI, I.; AVERBUKH, Z.; SANDBANK, J. Role of IL-10 in the progression of kidney disease. **World journal of transplantation**, v. 3, n. 4, p. 91–98, 2013.

SZYPOWSKA, A.; STELMASZCZYK-EMMEL, A.; DEMKOW, U.; LUCZYŃSKI, W. Low frequency of regulatory T cells in the peripheral blood of children with type 1 diabetes diagnosed under the age of five. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 60, n. 4, p. 307–13, 2012.

TEGOSHI, H. Et al. Polymorphisms of Interferon-gama gene CA-repeat and interleukin-10 promoter region (-592 A/C) in Japanese type 1 diabetes. **Hum Immunol**, 63: 121-128, 2002.

URCELAY, E.; SANTIAGO, J. L.; LA CALLE, H. DE; et al. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish type 1 diabetes patients. **Genes and immunity**, v. 5, n. 4, p. 306–9, 2004.

WANG, Y.; LIU, X.-H.; LI, Y.-H.; LI, O. The paradox of IL-10-mediated modulation in cervical cancer. **Biomedical reports**, v. 1, n. 16, p. 347–351, 2013.

ZHU, H.; LEI, X.; LIU, Q.; WANG, Y. Interleukin-10-1082A/G polymorphism and inflammatory bowel disease susceptibility: a meta-analysis based on 17,585 subjects. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 146–53, 2013. .

ZHENG, X.X.; STEELE, A.W.; HANCOCK, W.W.; STEVENS, A.C.; NICKERSON, P.W.; ROY-CHAUDHURY, P.; TIAN, Y.; STROM, T.B. A noncytolytic IL-10/Fc fusion

protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice. **J Immunol** 158:4507, 1997.

### 3. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O DM1 consiste em uma doença multifatorial, autoimune, resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais. No DM1, o componente genético é muito forte e apresenta um padrão complexo de associações genéticas, contudo, a patogênese da doença ainda não foi elucidada como também todos os genes envolvidos no processo. Estudos de GWAS revelam possíveis loci de genes candidatos para a patogênese da doença, entre eles o da IL10 (BAKAY; PANDEY; HAKONARSON, 2014).

Neste estudo realizado com a população pernambucana não houve diferenças estatísticas significativas nas frequências alélicas e genotípicas para os três SNPs entre pacientes DM1 e indivíduos controles e também na associação com a susceptibilidade ao DM1, concordando com resultados encontrados em outras populações como na japonesa, espanhola, francesa e turca (IDE et al., 2002; TEGOSHI et al., 2002; URCELAY et al., 2004; REYNER et al., 2006; MOHEBBATIKALJAHÍ et al., 2009). Os egípcios encontraram uma associação protetora com o rs1800896. (AL-SHEHMANY et al., 2014).

Diferentemente dos dados encontrados na literatura, o rs1800872 não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população pernambucana. Este fato pode ser explicado pela heterogeneidade desta população relatada por ARAUJO et al. (2007) ou pela influência de algum fator evolutivo, seria necessário a realização de um estudo populacional para esclarecer o que está deixando a população fora do equilíbrio para esse SNP.

Os pacientes, desse estudo, também foram investigados quanto a presença de AITD e DC, a frequência encontrada foi similar a outros estudos para o DM1 associado com tireoidite e menores do que relatadas para DM1 e DC e, DM1, AITD e DC concomitantes. Os SNPs não estavam associados com a insurgência de AITD E DC (EISENBARTH, 2004; QUEIROZ, 2008).

Em relação à análise dos haplótipos foi verificado que os SNPs estudados estão em forte desequilíbrio de ligação e os haplótipos mais frequentes foram o ATA, GCC e ATC, nos pacientes e indivíduos saudáveis, não foi encontrada associação com a susceptibilidade ao DM1 conforme estudos realizados nas populações da França, Espanha, Japão (URCELAY et al 2004;. REYNIER et al 2006; IDE et al, 2002). Contudo, observaram-se diferenças nas frequências alélicas de uma população para outra, fortalecendo a hipótese de que esta variação está associada a etnia (IDE et al. 2002)

Nesse estudo foi encontrada associação do rs1800871 com diagnóstico tardio, sugerindo uma possível função protetora desse SNP corroborando com os achados em japoneses, a média de idade da população pernambucana foi similar da encontrada em franceses, e menor que dos japoneses. (REYNIER et al., 2006; IDE et al (2002), os franceses não encontraram nenhuma associação.

Esses resultados fornecem evidências de que os polimorfismos na sequência desse gene não estão envolvidos com a susceptibilidade ao DM1, nem com a insurgência de AITD E DC, já que não foi encontrada nenhuma associação na população de estudo e em outras populações.

Outro resultado importante foi que a expressão da IL 10 estava aumentada nos pacientes quando comparada aos controles e 4.3 vezes mais expressa na faixa etária correspondente a média de idade de diagnóstico dos pacientes estudados nessa população. Estes dados evidenciam a ação inflamatória da IL-10 no DM1, acredita-se que este aumento da produção de IL-10 piora o quadro de insulite, acelerando a destruição das células  $\beta$  pancreáticas.

Outros estudos também relatam que o agravamento da insulite estava associado ao aumento na produção da IL-10 e que na patogênese do DM1, o grupo Th2 induz componentes da imunidade anti-células  $\beta$ , através, principalmente, da ação dessa citocina (WONGENSEN; LEE; SARVETNICK, 1994; LEE et al, 1996; MORITANI et al, 1996, ALMAWI; TAMIM; AZAR, 1999; SINUANI et al, 2013; SAXENNA et al, 2014).

Em outras patologias autoimunes e inflamatórias também foi descrito o papel inflamatório da IL-10. No LES, um aumento na síntese de IL10 provocava um aumento na hiperatividade dos linfócitos B aumentando a produção e deposição de imunocomplexos, e ocorreu uma diminuição da produção de autoanticorpos em um estudo in vitro de depleção de IL-10 com anti-anticorpo IL-10. (LYER; CHENG, 2012). A partir de estudos com doenças renais, Sinuani et al. (2013) relataram que o aumento de IL 10 promovia a deposição de complexos imunes mesangiais contribuindo para a progressão da lesão glomerular e constatou níveis elevados de IL10 em pacientes diabéticos com nefropatia diabética.

Nos pernambucanos não foi encontrada associação dos níveis de expressão da IL-10 com os SNPs estudados, contudo foi relatado que o haplótipo ATA está relacionado a uma baixa produção de IL-10 e o GCC com alta produção (IDE et al, 2002).

A IL10 é uma citocina pleiotrópica, que possui uma regulação de expressão complexa, envolvendo várias fases, estímulos e células. É uma potente estimuladora de LB, aumentando a ativação, proliferação e diferenciação e tempo de sobrevivência

destas células, levando a uma maior produção de anticorpos, caracterizando sua ação próinflamatória (SINUANI et al., 2013; SAXENA et al., 2014). Para entender a regulação gênica é preciso considerar o local de produção, a especificidade do tecido, o tipo de estímulo e a variação genética individual (LYER; CHENG, 2012).

A partir deste estudo e de dados da literatura é possível inferir que o gene da IL-10 é um forte candidato na patogênese do T1D e propor que o aumento na síntese dessa citocina provoca um aumento na produção e hiperatividade de LB autorreativos aumentando a produção e deposição de imunocomplexos no pâncreas, agravando o processo de insulite.

Como havia sido hipotetizado, a IL-10 está envolvida na patogênese do DM1, na população pernambucana, desenvolvendo seu papel inflamatório, contudo não é através dos SNPs estudados. Assim surge a necessidade de continuar investigando o mecanismo de participação da IL-10 na patogênese do DM1 como possível biomarcador de diagnóstico precoce, prognóstico e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Basic immunology**: functions and disorders of the immune system. Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier, 2008.

ANAYA J. M; ROJAS-VILLARRAGA A; GARCÍA-CARRASCO M. The autoimmune tautology: from polyautoimmunity and familial autoimmunity to the autoimmune genes. **Autoimmune Dis.** p: 297-193, 2012.

AKANE IDE et al. Genetic Association Between Interleukin-10 Gene Promoter Region Polymorphisms and Type 1 Diabetes Age-at-Onset. **Human Immunology** 63, 690–695 (2002).

ALMAWI W. Y., TAMIM H. AND AZAR S. T. T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type I (insulin dependent) diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 1999; 84, 1497–1502.

AL-SHEHMANY, A. S.; EL-KAFOURY, A. A.; HAROUN, M. A.; EMBABY, A. M. Contribution of IL-10 ( SNP -819 C / T and SNP-1082 G / A ) polymorphisms variants to the risk of type 1 diabetes in Egyptian population ( SNP -819 C / T و 10 - نيجن نيكولرتتلا ) . , v. 13, n. 1, p. 54–60, 2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 37Suppl 1:S81-S90, Jan 2014.

ANDERSON, M. S. Update in Endocrine Autoimmunity. **J Clin Endocrinol Metab.** v 93, n 10, p 3663–3670. Oct 2008.

ARAUJO, J.; BRANDÃO, L. A C.; GUIMARÃES, R. L.; et al. Mannose binding lectin gene polymorphisms are associated with type 1 diabetes in Brazilian children and adolescents. **Human Immunology**, v. 68, p. 739–743, 2007.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H.D. Interleukin-10 Therapy- Review of a New Approach. **Pharmacol Rev.** v. 55: 241-269, 2003.

ATKINSON, M. A; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 383, n. 9911, p. 69–82, 2014.

BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA, A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. **Diabetes care**, v. 35 Suppl 1, p. S64-71, jan. 2012. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 45, n. 2, p. 175-180, abr. 1999.

BAKAY, M.; PANDEY, R.; HAKONARSON, H. Genes envolvidos na Diabetes Tipo 1 : uma atualização. , v. 4, n. 3, p. 1–17, 2014.

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

BOLLI, G. Long- term intervention studies usind insulin in patients with 1 type diabetes. **Endocrine Practice: official journal of the Ameican College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists**, v 12 Suppl 1, p. 80-4, 2006.

BLUESTONE J. A.; HEROLD K.; EISENBARTH G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**. v 29; n 464, p 1293- 7293 300, Apr. 2010

BUCHANAN, C. C.; TORSTENSON, E. S.; BUSH, W. S.; RITCHIE, M. D. A comparison of cataloged variation between International HapMap Consortium and 1000 Genomes Project data. **Journal of the American Medical Informatics Association : JAMIA**, v. 19, n. 2, p. 289–94, 2012.

BURKE, G. W.; CIANCO, G.; SOLLINGER, H. W.; Advances in pancreas transplantation. *Transplantation*, 77: 62-7, 2004.

CANIVELL, S.; GOMIS, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4-5, p. 403–407, 2014.

CARLTON, V. E. H.; IRELAND, J. S.; USECHE, F.; FAHAM, M. Functional single nucleotide polymorphism-based association studies. **Human genomics**, v. 2, n. 6, p. 391–402, 2006.

CERNEA, S.; BUZZETTI, R.; POZZILLI, P.  $\beta$ -Cell Protection and Therapy for Latent Autoimmune Diabetes in Adults. **Diabetes Care**. v 32, Suppl 2, S246–S252, Nov 2009.

COHN, A.; SOFIA, A. M.; KUPFER, S. S. Type 1 diabetes and celiac disease: clinical overlap and new insights into disease pathogenesis. **Current diabetes reports**, v. 14, n. 8, p. 517, 2014.

COPPIETERS, K. T; WIBIRG, A.; TRACY, S. M.; VON HERRATH, M. G. Immunology in the clinic review series: focus on type 1 diabetes and viruses: the role of viruses in type 1 diabetes: a difficult dilemma. *Clin. exp. immunol*, 168: 5-11, 2012.

CRUVINEL, W. D. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; et al. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 11, p. 434–61, 2010.

DA SILVA, M. E. R., D. M. & E. D. Marcadores Genéticos e Auto-Imunes do Diabetes Melito Tipo 1: da Teoria para a Prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, p. 15, 2008.

DIAMOND PROJECT GROUP. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes world wide 1990-1999. **Diabet Med** v 23 n 8, p 857-866, Aug 2006.

DIB, S. A. Heterogeneidade do diabetes melito tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 205–218, 2008.

DRESCHER, K. M.; HERRATH, M. VON; TRACY, S. Enteroviruses, hygiene and type 1 diabetes: toward a preventive vaccine. **Reviews in medical virology**, 2014.

EGIDI, F. M. Management of hyperglycemia after pancreas transplantation: are new immunosuppressants the answer? **Drugs**, v. 65: 153-66, 2005.

EISENBARTH, G.S. (2004) Type 1 diabetes: molecular, cellular and clinical immunology. **Adv Exp Med Biol**, 552:306-10, 2004.

EURODIAB ACE STUDY GROUP. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. **Lancet** v 355, n 9207, p 873-876, 11 Mar 2000.

FIFE, B. T.; GRIFFIN, M. D.; ABBAS, A. K. LOCKSLEY, R. M.; BLUESTONE, J. A. Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist. **J. Clin Invest**, Aug; 116(8): 2252-61, 2006.

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

FIORENTINO, D. F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med**, v. 170: 2081-2095, 1989.

FLÓREZ, O.; MARTIN, J.; GONZÁLEZ, C. I. Interleukin 4, interleukin 4 receptor- $\alpha$  and Interleukin 10 gene polymorphisms in Chagas disease. *Parasite Immunol*, 33 (9): 506-11, 2011).

FORGA, L.; GOÑI, M. J. Luces y sombras en la epidemiología de la diabetes de tipo 1. **Avances en Diabetología**, v. 82, n. 2, p. 1–7, 2014.

FORLENZA, G. P.; REWERS, M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 18, n. 4, p. 248–51, 2011.

GIBBS, J. R.; SINGLETON, A. Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond. **PLoS genetics**, v. 2, n. 10, p. e150, 2006.

GISLLESPIE, K. M. Type 1 diabetes pathogenesis and prevention. **Can Med. Assoc. J**, 175: 165-70, 2006.

GONZÁLEZ, J. R.; ARMENGOL, L.; SOLÉ, X.; et al. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 5, p. 644–5, 2007.

GREENHILL, C. J.; JONES, G. W.; NOWELL, M. A.; et al. Interleukin-10 regulates the inflammasome-driven augmentation of inflammatory arthritis and joint destruction. **Arthritis Research and Therapy**, 16; p. 1–10, 2014.

GROOP, L.; POCIOT, F.; Genetics of diabetes. Are we missing the genes or the disease? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382 p. 726-739, 2014.

HANSEN, M. P.; KAHALY, G.J.,. Autoimmune polyglandular syndromes, **Dtsch Med Wochenschr**. 2013 Feb;138(7):319-26; quiz 327-8.

HARTSTEIN, P.; MACHADO, R. Review article Influence of genetic polymorphisms ( IL-10 / CXCL8 / CXCR2 / NF  $\kappa$  B ) on the susceptibility of autoimmune rheumatic diseases. , v. 4, 2014.

HOFFMAN, R. P. Practical management of type 1 diabetes mellitus in adolescent patients challenges and goals. **Treatments in endocrinology**, v. 3, n. 1. p-27-39, jan, 2004.

HUNTCHINS, A.P.; DIEGO,D.; MIRANDA-SAAVEDRA,D. The IL-10/STAT3- mediated anti-inflammatory response:recent developments and future challenges. **Briefings in functional genomics**, agosto 2013.

IDE, A.; KAWASAKI, E.; ABIRU, N.; et al. Genetic association between interleukin-10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-at-onset. **Human Immunology**, v. 63, n. 8, p. 690–695, 2002.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas, 6ed* Bruxelas, Bélgica: Federação Internacional de Diabetes, 2013.

KAWASAKI, E. Type 1 Diabetes and Autoimmunity. , v. 23, n. 4, p. 99–105, 2014.

KEYMEULEN, B.; WALTER, M.; MATHIEU, C.; KAUFMAN, L.; GORUS, F.; HILBRANDS, R. Pipeleers, D-four- year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent- onset type 1 diabetes patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. **Diabetologia**, 53: 614-23, 2010.

KIM, S.; MISRA, A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. **Annual review of biomedical engineering**, v. 9, p. 289–320, 2007.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B.A. **Imunologia de Kuby**. 6 ed, Porto Alegre: Artmed, 2008.

KITTARIS, V.C. Systemic Lupus Erythematosus: From Genes to Organ Damage. **Methods Mol Biol** 662: 265-283, 2010.

LANDER, E. S. Initial impact of the sequencing of the human genome. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 187–97, 2011.

LEE, M. S, MUELLER, R, WICKER, L. S, PETERSON, L. B, SARVETNICK, N. IL-10 is necessary and sufficient for autoimmune diabetes in conjunction with NOD MHC homozygosity. **J Exp Med** 183:2663, 1996.

LEMPAINEN, J.; ILONEN, J. Influence of type 1 diabetes genes on disease progression: similarities and differences between countries. **Curr. diab. rep**, 12:447–55, 2012.

LEWIN B. **Genes**. Editora Oxford University Press. New York, 1997.

LINDSAY J.O.; HODGSON, H.J. Review article: the immunoregulatory cytokine IL-10: a therapy for Crohn's disease? **Aliment Pharmacol Ther** 15:1709–1716, 2001.

LITTORIN, B.; BLOM, P.; SCHÖLIN, A; ARNQVIST, H. J.; BLOHMÉ, G.; BOLINDER, J.; EKBOM-SCHNELL, A.; ERIKSSON, J.W.; GUDBJÖRNSDOTTIR, S.; NYSTRÖM, L. 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**, 49:2847–52, 2006.

LYER; CHENG, 2012. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. **Crit Rev Immunol**, 32(1): 23–6, 2012.

- MAITRA, A. ABBAS, A K. **O Sistema Endócrino - Robbins & Cotran, Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier. Editora Ltda, 2010.
- MALLONE, R.; BREZAR, V.; BOITARD, C. T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives. **Clin. dev. Immunol**, 1-16, 2011.
- MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; et al. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 11, p. 552–580, 2010.
- MOHEBBATIKALJAH, H.; MENEVSE, S.; YETKIN, I.; DEMIRCI, H. Study of interleukin-10 promoter region polymorphisms (–1082A/G, –819T/C and –592A/C) in type 1 diabetes mellitus in Turkish population. **Journal of Genetics**, v. 88, n. 2, p. 245–248, 2009.
- MOORE, K. W.; DE WALL, M. R.; COFFMAN, R.L.; O' GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19: 683-765, 2001.
- MORITANI, M.; YOSHIMOTO, K.; TASHIRO, F.; HASHIMOTO, C.; MIYAZAKI, J.; II S, KUDO.; E, IWAHANA.; H, HAYASHI.; Y, SAN. T. Transgenic expression of IL-10 in pancreatic islet A cells accelerates autoimmune insulinitis and diabetes in non-obese diabetic mice. **Int Immunol**, v. 6:1927, 1994.
- NA, K. S.; JUNG, H. Y.; KIM, Y. K. The role of pro-inflammatory cytokines in the neuroinflammation and neurogenesis of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 48, p. 277–286, 2014.
- NASCIMENTO, L.C.; AMARAL, M.J.; SPARAPANI, V.C.; FONSECA, L.M.M.; NUNES, M.D.R.; DUPAS, G. Diabetes Mellitus tipo 1: evidências na literatura para seu manejo adequado, na perspectiva de crianças. **Rev Esc Enferm USP**, 45 (3): 764-9, 2011.
- NEGRATO, CA et al. Temporal Trends in Incidence of Type 1 Diabetes between 1986 and 2006 in Brazil- **Journal of Clinical Investigation** 2010.
- NG, T.H.S. et al., Interleukin-10 regulates adaptive immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 4, artigo 129, maio 2013.
- NOBLE, J. A.; ERLICH, H. A.; Genetics of Type 1 diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2 (1), 2012.
- 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, 2013.
- PARADOWSKA, A.; MASLINISK, W. GRZYBOWSKA-KOWALCZYK, A.; LACKI, J. The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, 55 (5): 329-34, 2007.
- PHARM, S.A.M.; GHOSH, B.; AL-DHUBIAB, B.E.; NAIR, A. B, Understanding Type 1 Diabetes: Etiology and Models. **Can J. Diabetes** , 37: 269-276, 2013.
- PENG, H. WANG, W.; ZHOU, M.; LI, R.; PAN, H.F.; YE, D.Q. Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus erythematosus. **Clin J Exp Med**, 179 (1), 305-310, 2013.

PIGOSSI, S.C. et al. Genetic association study between interleukin 10 gene and dental implant loss. **Archives of oral Biology**. v. 57: 1256-1263, 2012.

PUGLIESE, A. The multiple origins of Type 1 diabetes. **Diabet Med**, 30(2):135-46, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. (OMS) Fact Sheet Diabetes. Genebra. Suíça: **Organização Mundial da Saúde**. 2012.

QUEIROZ, M. S. Type 1 diabetes and autoimmune polyendocrine syndromes. **Arq bras de endocrinol metab**, 52:198–204, 2008.

REGNELL, S.B.; LERNMARK, A. The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes. **Diabet Med**, 30 (2): 155-150, 2013.

REYNIER, F.; CAZALIS, M.-A.; LECOQ, A.; et al. Lack of association of IL-10 promoter gene variants with type 1 diabetes in a French population. **Human immunology**, v. 67, n. 4-5, p. 311–7, 2006.

RICHARD-MICELI, C.; CRISWELL, L. A. Emerging patterns of genetic overlap across autoimmune disorders. **Genome medicine**, v. 4, n. 1, p. 6, 2012.

RICHAUD-PATIN, Y. et al., Role of interleukin 10 in autoimmunity: physiological and pathological implications/Papel da Interleucina 10 na autoimunidade: implicações fisiológicas e patológicas. **Rev. bras. Reumatol**. V. 37(3): 159-64, maio-jun. 1997.

ROITT, I.; DELVES, P. J. **Fundamentos de Imunologia**. Décima edi ed. [S.I.] Editora Guanabara Koogan, 2004.

ROJAS-VILLARRAGA, A et al. Introducion Polyautoimmunity: Secondary Autoimmune Disease no longer exist. **Autoimunidade Dis**, p 254-319, 2012.

RYAN, E. A.; PATY, B. W.; SENIOR, P. A.; BIGAM, D.; ALFADHLI, E.; KNETEMAN, N. M.; SHAPIRO, A. M. J. Five-years follow-up after clinical islet transplantation. **Diabetes**, v. 54: 2060-9, 2005.

SAXENA, A.; KHOSRAVIANI, S.; NOEL, S.; et al. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. **Cytokine**, 2014.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SHIN et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to HIV by promoter alleles of IL-10. **PNAS**, v. 97, n. 26, p. 14471, 2000.

SILVA, M. E. R.; MORY, D. DAVINI, E. Marcadores Genéticos e Auto-ímenes do Diabetes Melito Tipo 1: da Teoria para a prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52: 166-180, 2008.

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.

SIMMONS, K.; MICHELS, A. W. Lessons from Type 1 Diabetes for Understanding Natural History and Prevention of Autoimmune Disease. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 40, n. 4, p. 797–811, 2014.

SINUANI, I.; BEBERASHVILI, I.; AVERBUKH, Z.; SANDBANK, J. Role of IL-10 in the progression of kidney disease. **World journal of transplantation**, v. 3, n. 4, p. 91–98, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). DIRETRIZES SBD 2013-2014  
Copyright © by SBD –2014

SOUZA, A. W. S. DE; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; et al. Sistema imunitário: parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 11, p. 665–679, 2010.

STECK, A.K, REWERS, M.J. Genetics of type1 diabetes. **Clin Chem**. V. 57(2):176-85, fev 2011.

SZYPOWSKA, A.; STELMASZCZYK-EMMEL, A.; DEMKOW, U.; LUCZYŃSKI, W. Low frequency of regulatory T cells in the peripheral blood of children with type 1 diabetes diagnosed under the age of five. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 60, n. 4, p. 307–13, 2012.

TAVARES, N. A; SANTOS, M. M.; MOURA, R.; et al. Interleukin 18 (IL18) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients. **Cytokine**, v. 62, p. 286–289, 2013.

TEGOSHI H et al. Polymorphisms of interferon-gamma gene CA-repeat and interleukin-10 promoter region (-592A/C) in Japanese type 1 diabetes. **Hum Immunol** 2002; 63: 121–128.

THROWER, S. L.; BINGLEY, P. J. What is type 1 diabetes? **Medicine**, v. 42, n. 12, p. 682–686, 2014. Elsevier Ltd.

TODD, J. A. Etiology of type 1 diabetes. **Immunity**, 32:457–67, 2010.

TURNER DM, WILLIAMS DM, SANKARAN D, ET AL. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**, 24:18, 1997.

URCELAY, E.; SANTIAGO, J. L.; LA CALLE, H. DE; et al. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish type 1 diabetes patients. **Genes and immunity**, v. 5, n. 4, p. 306–9, 2004.

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

VIRTANEN, S. M.; LÄÄRÄ, E.; HYPPÖNEN, E.; REIJONEN, H.; RÄSÄNEN, L.; ARO, A.; KNIP, M.; ILONEN, J.; AKERBLUM, H.K. Cow's Milk Consumption, HLA-DQB1 Genotype, and Type 1 Diabetes A Nested Case-Control Study of Siblings of Children With Diabetes, **Diabetes**, 49(6): 912-7, 2000.

- VOIGHT, B. F.; COTSAPAS, C. Human genetics offers an emerging picture of common pathways and mechanisms in autoimmunity. **Current opinion in immunology**, 2012.
- WANG, Y.-C.; SUNG, W.-W.; WU, T.-C.; et al. Interleukin-10 haplotype may predict survival and relapse in resected non-small cell lung cancer. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e39525, 2012.
- WANG, Y.; LIU, X.-H.; LI, Y.-H.; LI, O. The paradox of IL-10-mediated modulation in cervical cancer. **Biomedical reports**, v. 1, n. 16, p. 347–351, 2013.
- WESTENDORP, R.G.; LANGERMANS, J.A.; HUIZINGA, T.W.; ELOUALI, A. H.; VERWEIJ, C.L.; BOOMSMA, D. I.; VANDENBROUCKE, J.P. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **Lancet**, 349: 170-73, 1997.
- WOGENSEN, L.; LEE, MS.; SARVETNICK, N. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of cells in non-obese diabetic mice. **J Exp Med**, 179:1379, 1994.
- YILMAZ, V.; YENTUR, S. P.; SARUHAN-DIRESKENELI, G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. **Cytokine**, 30, 188–194, 2005.
- YURASOV, S.; TILLER, T.; TSUIJI, M.; VELINZON, K.; PASCUAL, V. WARDEMANN, H.; NUSSENZWEIG, C.M. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. **J Exp Med**, 203: 2255- 2261, 2006.
- ZHANG, A.; QIU, S.; XU, H.; SUN, H.; WANG, X. Metabolomics in diabetes. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 429, p. 106–10, 2014.
- ZHANG, L.; CHEN, Y.; LI, C.; et al. Protective effects of combined intervention with adenovirus vector mediated IL-10 and IGF-1 genes on endogenous islet  $\beta$  cells in nonobese diabetes mice with onset of type 1 diabetes mellitus. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e92616, 2014.
- ZENEWICK, L.A.; ABRAHAM, C.; FLAVELL, R.A.; CHO, J.H. Unraveling the genetics of autoimmunity. **Cell**, 140: 791-7, 4: 146-51, 2010.
- ZHU, H.; LEI, X.; LIU, Q.; WANG, Y. Interleukin-10-1082A/G polymorphism and inflammatory bowel disease susceptibility: a meta-analysis based on 17,585 subjects. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 146–53, 2013.

## **ANEXOS**

Instituto de Medicina Integral  
Prof. Fernando Figueira  
Escola de Pós-graduação em Ciências Médicas - Integral  
Instituição de Ensino Superior



**DECLARAÇÃO**

Declaro que o projeto de pesquisa nº 1717 intitulado "Fatores de risco preditivo envolvidos com a diabetes mellitus do tipo 1: um modelo auto-imune usando novos marcadores moleculares com a criação de um banco de amostras biológicas informatizados" apresentado pelo pesquisador Sérgio Crovella foi **APROVADO AD REFERENDUM** pelo Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira - IMIP, em 12 de abril de 2010.

Recife, 12 de abril de 2010.

  
**Dr. José Eulálio Cabral Filho**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa em Seres Humanos do  
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

## ANEXO B TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: "Fatores de riscos preditivos envolvidos com a Diabetes Mellitus do tipo 1: um modelo auto-imune usando novos marcadores moleculares com a criação de um banco de amostras biológicas e informatizado."

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

(Crianças e adolescentes com doenças auto-imunes)

Título da pesquisa: "Fatores de riscos preditivos envolvidos com a Diabetes Mellitus do tipo 1: um modelo auto-imune usando novos marcadores moleculares com a criação de um banco de amostras biológicas e informatizado."

Responsável pelo projeto: Prof. Dr. Sergio Crovella

Estamos realizando uma pesquisa sobre a presença de defeitos genéticos para realização será necessária a extração de DNA, através dele poderemos verificar a produção de substâncias do sistema imune em pessoas que tem doença auto-imune da diabetes, tireóide e celíaca.

Essas substâncias são proteínas que fazem parte do sistema de defesa do nosso organismo. Os defeitos genéticos levam a níveis mais baixos no sangue que pode fazer com que a pessoa tenha mais facilidade de adquirir infecções e outras doenças. Além disso, pessoas com essas substâncias baixas no sangue podem ter maior tendência a desenvolver algumas doenças como a artrite reumatóide, doença celíaca e lúpus. A pessoa pode ter essa substância baixa no organismo e não sentir nada.

Estamos fazendo essa pesquisa para tentar descobrir se as pessoas que tem doença auto-imune da diabetes, tireóide e celíaca apresentam defeitos genéticos e alguma relação entre elas.

Com sua autorização, iremos coletar (3ml) de sangue que será colhido por técnico especializado, ou seja, seu filho(a) não sofrerá prejuízo algum, além dos provocados pela coleta do sangue como: náusea, vermelhidão e dor no braço no local da coleta. deste modo seu filho não será exposto a nenhum risco além dos provocados pelos exames de rotina de controle do problema da diabetes, tireóide ou da celíaca e que já foram solicitados pelo seu médico.

Solicitamos também a sua autorização para utilizar dados do prontuário como idade, sexo, idade que iniciou a doença, tempo de doença e os resultados dos últimos exames de rotina que foram realizados no seu filho para avaliar o controle do problema da diabetes, tireóide ou celíaca.

**Será garantido total sigilo, privacidade e anonimato nos resultados.**

Caso seja encontrada alguma alteração nos exames, você será comunicado e explicaremos o que já se sabe a respeito do que pode acontecer com as pessoas que tem essa substância baixa no sangue e o que poderá ser feito para evitar essas doenças. O médico do seu filho(a) também será comunicado dos exames realizados pela nossa equipe. **Caso não queira autorizar seu filho(a) a participar desta pesquisa, ele(a) continuará a receber o mesmo atendimento que sempre recebeu neste hospital.**

Eu li, compreendi e autorizo que seja realizado a avaliação genética de substância do sistema de defesa do organismo na minha amostra de sangue colhida ou do meu filho(a)

Regist.       \_\_\_\_\_

RG/CPF: \_\_\_\_\_

(Paciente ou Responsável)

Concordo que os dados obtidos sejam utilizados para pesquisa. Recife, \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Nome: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do responsável por menor 16 anos)

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do paciente maior de 16 anos)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Testemunha 1

\_\_\_\_\_  
Testemunha 2