

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Natassia Javorski Rodrigues

**ANÁLISE DO EFEITO DA GLICOSE NO NÍVEL DE EXPRESSÃO DO
RECEPTOR DC-SIGN (CD209) *IN VITRO* EM PACIENTES COM DIABETES
MELLITUS TIPO 1 E 2**

**Recife
2018**

Natassia Javorski Rodrigues

**ANÁLISE DO EFEITO DA GLICOSE NO NÍVEL DE EXPRESSÃO DO
RECEPTOR DC-SIGN (CD209) *IN VITRO* EM PACIENTES COM DIABETES
MELLITUS TIPO 1 E 2**

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

Orientador: Prof^ª Dr^ª Paula Sandrin Garcia
Co-orientador: Prof^ª Dr^ª Jaqueline de Azevêdo Silva

**Recife
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Rodrigues, Natassia Javorski

Análise do efeito da glicose no nível de expressão do receptor DC-SIGN (CD209) *in vitro* em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1 e 2/ Natassia Javorski Rodrigues - 2018.

57 folhas: il., fig.

Orientadora: Paula Sandrin-Garcia

Coorientadora: Jacqueline de Azêvedo Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação de Genética.

Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. Diabetes 2. Imunogenética 3. Glicose I. Sandrin-Garcia, Paula (orient.) II. Silva, Jacqueline de Azevêdo (coorient.) III. Título

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-154

Natassia Javorski Rodrigues

**ANÁLISE DO EFEITO DA GLICOSE NO NÍVEL DE EXPRESSÃO DO
RECEPTOR DC-SIGN (CD209) *IN VITRO* EM PACIENTES COM DIABETES
MELLITUS TIPO 1 E 2**

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

Aprovado em 19 / 02 / 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr^a Jaqueline de Azevêdo Silva
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr^a Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr Bruno de Melo Carvalho
Universidade de Pernambuco (UPE)

Dr^a Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Aos meus avós Vanda e Estanilau, por sempre terem
acreditado em mim.

Aos meus pais Marly e João Alberto, que sempre me
apoiaram e respeitaram minhas escolhas.

Às minhas irmãs Andreyana e Maria Clara, pelas alegrias e
amor incondicionais.

Ao meu esposo Leandro, por sua paciência, apoio,
companheirismo e grande amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, antes de tudo por ter me concedido a força e a oportunidade para seguir em frente mesmo quando era mais fácil desistir. Sou eternamente grata!

Aos meus pais, Marly e João, por acreditarem em mim de forma incondicional, por todos os seus esforços em tornar real a minha sede de conhecimento. Todo o meu amor e as palavras de agradecimento serão sempre insuficientes para demonstrar a minha gratidão.

À minha irmã Andreyana, que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava, que me inspira todos os dias a ser um ser humano melhor, todo o meu amor. À minha irmã Maria Clara, por ser meu exemplo de felicidade e amor, carinho e por sua confiança todo o meu amor.

Ao meu esposo Leandro, por nunca ter me deixado desistir mesmo quando já não haviam mais forças para lutar, por seu amor, carinho e compreensão em todos os meus momentos de estresse e abusos. Por me fazer a pessoa mais feliz! E principalmente por vivenciar e se alegrar com as minhas conquistas como se fossem suas.

À minha tia Marlene e minha vó Vanda, por me ensinarem a amar e perdoar independente dos acontecimentos. À minha tia Márcia e a minha prima Bárbara, por cuidarem de mim em momentos tão difíceis. Meu eterno muito obrigada!

À minha orientadora Prof. Dr^a Jaqueline Azêvedo, pela confiança e pelos ensinamentos que foram essenciais para que eu pudesse concluir mais essa etapa acadêmica, tenho muita admiração por você a sua maneira de fazer ciência me inspira. Espero ser sempre digna dessa confiança. Meu mais sincero obrigada!

Aos meus “anjos” do LIKA, Eduarda e Suellen por me fazerem sempre rir durante o trabalho, trabalhar na presença de vocês foi sempre mais divertido.

As minhas amigas Rebeca e Amanda, pela torcida e orgulho incondicionais. Sou abençoada por ter vocês em minha vida.

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

*“Pedras no caminho? Eu guardo todas.
Um dia vou construir um castelo.”
Nemo Nox*

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica, caracterizada pela hiperglicemia sendo relacionada com uma série de fatores genéticos e ambientais. As células dendríticas (DCs) induzem a resposta imunológica por sua capacidade de capturar, processar e apresentar antígenos a linfócitos T. O reconhecimento dos diferentes microrganismos pelas DCs é feito por receptores expressos em sua membrana que interagem com padrões moleculares presentes em patógenos como por exemplo, os açúcares. O DC-SIGN é um desses receptores capaz de reconhecer moléculas de manose e fucose, sendo a glicose similar estruturalmente à manose, principal tipo de açúcar reconhecido pelo receptor. O objetivo deste trabalho é avaliar a ativação do DC-SIGN pela molécula de glicose, bem como as funções preditas para os polimorfismos rs735239 e rs4804803, encontrados na região promotora do gene. As análises de expressão gênica foram realizadas em amostras de sangue total de pacientes DM e controles saudáveis, sendo, posteriormente, as culturas celulares estimuladas com glicose. As análises foram realizadas pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Identificamos expressão diferencial do *CD209* entre os indivíduos com DM e o grupo controle, estando o gene mais expresso nos indivíduos com DM (2,66/DM1 e 3,24/DM2). Posteriormente, a análise da ativação desse gene pela molécula de glicose, também demonstrou uma expressão diferencial de 11,97 vezes do *CD209* nas culturas estimuladas com glicose. Nossos resultados indicam que a glicose pode modular a expressão do *CD209*.

Keywords: Diabetes *Mellitus* tipo 1, Diabetes *Mellitus* tipo 2, *CD209*, DC-SIGN e glicose.

ABSTRACT

Diabetes *Mellitus* (DM) is a metabolic disease characterized by hyperglycemia being associated with several genetic and environmental factors. Dendritic cells (DCs) induce the immune response by their ability to capture, process and present antigens to T lymphocytes. The recognition of different microorganisms by DCs is done through receptors expressed in the membrane of these cells that interact with molecular patterns found in pathogens, as for example, the sugars. DC-SIGN is one of these receptors capable of recognizing molecules of mannose and fucose – sugars with similar structures to glucose. The aim of this study is to evaluate the activation of DC-SIGN by the molecule of glucose, as well as the predicted functions for the polymorphisms rs735239 and rs4804803, found in the promoter region of these gene. The gene expression analysis were performed in blood samples of DM patients and healthy controls, and subsequently cell cultures were stimulated with glucose. We identified differential expression of *CD209* between individuals with DM and the control group, being the gene overexpressed in individuals with DM (2.66/DM1 and 3.24/DM2). Afterwards, the analysis of *CD209* gene activation by the molecule of glucose, also showed a differential expression of 11.97 times overexpressed in cultures stimulated with glucose. Our results indicate that glucose can modulate the expression of *CD209*.

Keywords: Type 1 diabetes, Type 2 diabetes, *CD209*, DC-SIGN and glucose.

Lista de Ilustrações

Figura 01 – Número estimado de pessoas com diabetes no mundo e por região em 2015 e estimativa para o ano 2040	18
Figura 02 – Os principais componentes envolvidos no processos que leva a destruição das células beta-pancreáticas no DM1.....	23
Figura 03 – O desenvolvimento do diabetes tipo 2	24
Figura 04 – Tipos de moléculas CLRs encontradas nas células dendríticas	31
Figura 05 – Função do DC-SIGN na migração das DCs, respostas da célula T e processamento do antígeno	33
Gráfico 01 – Comparação da expressão do RNAm <i>CD209</i> entre os diabéticos e o grupo controle	42
Gráfico 02 – - Expressão relativa de RNAm do <i>CD209</i> de acordo com o genótipo em indivíduos com DM1	43
Gráfico: 03 – Expressão relativa de RNAm do <i>CD209</i> de acordo com o genótipo em indivíduos com DM2	44
Gráfico 04 – Expressão relativa de RNAm do <i>CD209</i> de acordo com o estímulo utilizado em células dendríticas	45
Gráfico: 05 – Expressão relativa de RNAm do <i>CD209</i> de acordo com o genótipo em células dendríticas estimuladas com glicose e LPS simultaneamente.....	46

Lista de Abreviaturas

ADA	<i>American diabetes association</i>
APC	Células apresentadoras de antígenos
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CLRs	Receptores lectinas tipo C
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidratos
CO ₂	Dióxido de carbono
DC	Células dendríticas
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-integrin</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestacional
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fiocruz	Centro de pesquisas Aggeu Magalhães
GAD-56	Antiácido glutâmico descarboxilase
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
Hb1Ac	Hemoglobina glicada
HC	Hospital das Clínicas
HLA	Sistema antígeno leucocitário humano
IAA	Anticorpo anti-insulina
ICA	Anticorpo anticélulas das ilhotas
IFN- γ	Interferon gama
IL-12	Interleucina 12
ITAM	<i>Tyrosine-based activation motif</i>
LIKA	Laboratório de imunopatologia Keizo Asami
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
OMS	Organização mundial de saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos

PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SBF	Soro fetal bovino
SDS	<i>Sequence detection software</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SUS	Sistema único de saúde
TCR	Receptor de células T
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.2 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS.....	18
2.2.1 Diabetes Mellitus tipo 1.....	18
2.2.2 Diabetes Mellitus tipo 2.....	19
2.2.3 Diabetes Mellitus gestacional	20
2.3 PATOGÊNESE DO DIABETES MELLITUS	21
2.4 IMUNOGENÉTICA DO DIABETES MELLITUS	24
2.5 AS CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	26
2.5.1 Reconhecimento de patógenos pelas DCs	28
2.5.2 Papel das DCs no Diabetes Mellitus	29
2.5.3 Receptores de lectina tipo C	30
2.5.4 DC-SIGN	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4 METODOLOGIA	35
4.1 TIPO DE ESTUDO E GRUPO AMOSTRAL	35
4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	35
4.3 EXTRAÇÃO DE RNA DE SANGUE TOTOAL PERIFÉRICO DE PACIENTES E CONTROLES.....	36
4.4 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL DE SANGUE PERIFÉRICO.....	36

4.5 DIFERENCIAÇÃO IN VITRO DE DCS A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO.....	37
4.6 TRIPSINIZAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS E ENSAIOS DE TRATAMENTO.....	38
4.7 EXTRAÇÃO DE RNA DAS CULTURAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	39
4.8 SÍNTESE DE cDNA	39
4.9 PCR EM TEMPO REAL	40
4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE CD209 (DC-SIGN) EM INDIVÍDUOS COM DM1 E DM2.....	42
5.2 EXPRESSÃO DO RNAm DO CD209 (DC-SIGN) DE ACORDO COM O GENÓTIPO PARA OS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NA REGIÃO 5'UTR DESSE GENE NOS PACIENTES	43
5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO CD209 (DC-SIGN) EM CULTURAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS APÓS O ESTÍMULO COM GLICOSE E LPS.....	44
5.4 EXPRESSÃO DO RNAm DO CD209 (DC-SIGN) DE ACORDO COM O GENÓTIPO PARA OS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NA REGIÃO 5'UTR DESSE GENE EM CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS A - PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus* (DM) é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, em sua ação ou em ambas, podendo levar a disfunção de vários órgãos e progressivas complicações, além de maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HU et al., 2011). O DM é classificado em tipo 1 (DM1) e 2 (DM2), sendo este último responsável por 90% dos casos mundiais (WHITING et al., 2011).

O DM1 e DM2 tem como característica em comum altos níveis de glicose circulante (IDF, 2015). A homeostasia glicêmica requer uma estreita regulação quantitativa e temporal do fluxo de glicose por diferentes órgãos. A maioria da glicose circulante no corpo encontra-se em uma configuração estável, sendo essa, similar as características bioquímicas da parede celular de bactérias comensais encontradas no indivíduo (SINGH et al., 2014).

No sistema imunológico, as interações hospedeiro-patógeno e hospedeiro-hospedeiro acontecem através do reconhecimento e ligação de oligossacarídeos nos denominados receptores lectinas tipo C (CLRs), que irão induzir uma resposta imune específica. Diversas lectinas tipo C reconhecem oligossacarídeos ricos em açúcares do tipo manose e fucose, possuindo esses uma estrutura semelhante à glicose (DRICKAMER; TAYLOR, 2015).

A imunidade inata e adaptativa estão intimamente ligadas e apresentam uma interregulação. A resposta imune inata inicia-se com o reconhecimento do organismo invasor, produção de agentes inflamatórios que estimulam a resposta adaptativa, reconhecimento e processamento de antígenos e posterior ativação de linfócitos (LEE, 2011). As células dendríticas (DCs) são um componente do sistema imune inato que estão intimamente relacionadas com a modulação da resposta imune. Dentre os diversos CLRs encontrados nas DCs o DC-SIGN (CD209) reconhece estruturas glicanas especificamente à manose (GEIJTENBEEK et al., 2000).

Devido a similaridade estereoquímica encontrada entre as estruturas de glicose e manose, e a capacidade de estimulação da expressão do gene *CD209* pelos lipopolissacarídeos ricos em manose encontrados na parede

celular de bactérias, esse trabalho procurou identificar a capacidade de ativação desse gene pela molécula de glicose. Além disso, avaliamos se as funções preditas para os polimorfismos (rs735239) e (rs4804803) encontrados na região promotora do *CD209* podem ser confirmadas em ensaios celulares.

Até o momento, sabe-se que polimorfismos no gene do DC-SIGN exercem um papel importante na imunidade dos indivíduos, com destaque para o rs735239 (DA SILVA *et al.*, 2014) associado diretamente com o DM1. Entretanto, a maneira como a presença deste SNP modula a resposta inflamatória ainda é desconhecida. Com base na hipótese proposta por Ilyas *et al.* (2011) sobre o reconhecimento de açúcares por células do sistema imune e a hipótese proposta por Silva *et al.* (2014) onde o excesso de glicose em pacientes com DM1 e DM2 levaria a uma resposta anti-inflamatória, é importante avaliar funcionalmente se tais hipóteses são de fato verdadeiras. Sabendo que a glicose pode ativar vias que antes eram conhecidamente pertencentes a doenças infecciosas, como HIV e Tuberculose por exemplo, pode-se identificar novos alvos de tratamento para os pacientes diabéticos que possam levar a um aumento da qualidade de vida através da diminuição de comorbidades inflamatórias associadas à doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES MELLITUS

De acordo com a *American Diabetes Association* (ADA), o Diabetes Mellitus (DM) corresponde a um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e/ou na ação da insulina. Vários processos patogênicos estão associados ao desenvolvimento do DM (CANIVELL; GOMIS, 2014).

O DM é considerado uma doença complexa, afetando aproximadamente 415 milhões de pessoas no mundo, o que resulta em 5,4% da população mundial adulta. Em aproximadamente 50% destas pessoas, o diabetes ainda não foi diagnosticado, prosseguindo a sua evolução de maneira silenciosa. Se os padrões demográficos atuais continuarem, a atual estimativa prevê que até 2040, existirão 642 milhões de diabéticos no mundo (Figura 01) (GUARIGUATA et al., 2014; IDF, 2015).

No Brasil, segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de diabéticos encontra-se em torno de 14,3 milhões, posicionando o país em quarto lugar de acordo com o número de adultos acometidos pela doença. Dados atualizados do Ministério da Saúde e índices do Sistema Único de Saúde (SUS) reportam que as complicações associadas ao diabetes totalizam 99% das mortes prematuras, sendo a maior causa de mortalidade e hospitalizações no Brasil (IDF, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Segundo os critérios atuais da OMS e da ADA, o diagnóstico da doença é baseado em uma das seguintes anormalidades: i) níveis de hemoglobina A1C (Hb1Ac) $\geq 5\%$, glicose de jejum ≥ 7 mg/dL, glicose plasmática ao acaso $\geq 11,1$ mg/dL, associadas com sintomas de poliúria, polidipsia e perda de peso inexplicada; ii) glicose plasmática $\geq 11,1$ mg/dL duas horas depois da carga de glicose em teste oral de tolerância à glicose (CANIVELL; GOMIS, 2014).

A classificação do DM proposta pela OMS (ALBERTI; ZIMMET, 1998) inclui quatro classes clínicas de diabetes de acordo com as diferenças etiológicas em: *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1), *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), *diabetes mellitus* gestacional (DMG); e ainda, tipos específicos, incluindo defeitos genéticos na função das células β ; defeitos genéticos na ação da

insulina; doença do pâncreas exócrino, endocrinopatias, formas induzidas por compostos químicos ou drogas, diabetes induzido por infecção, formas incomuns de diabetes imuno-mediadas e outras síndromes genéticas associadas ao diabetes.

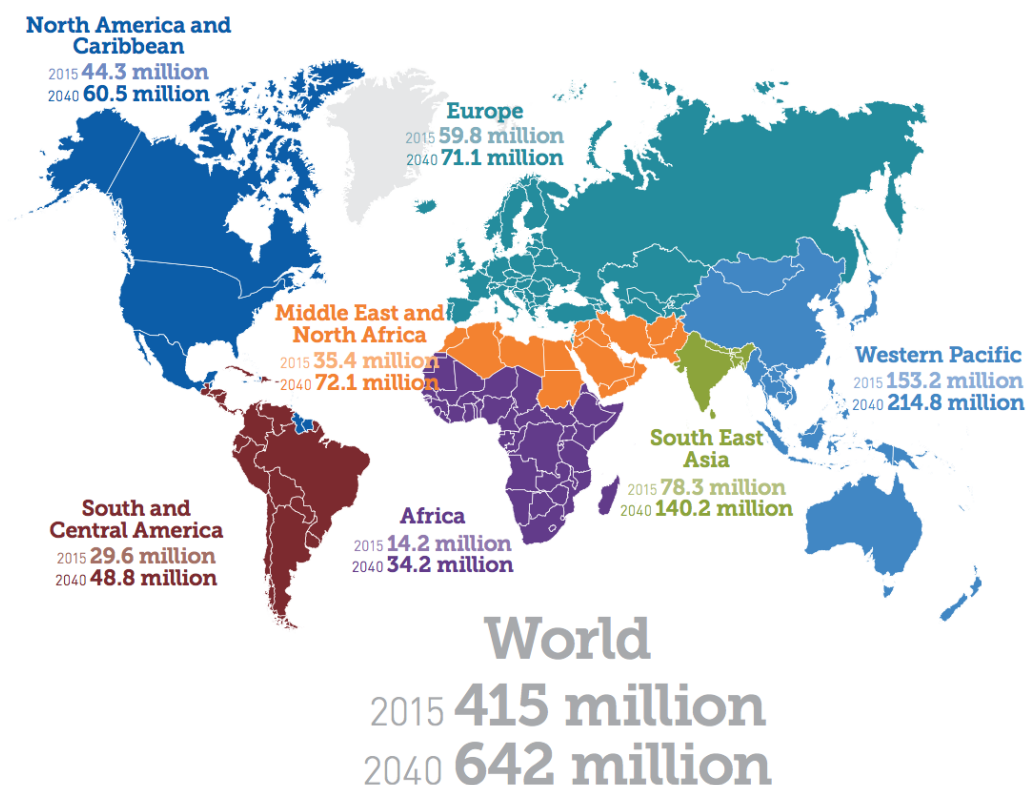


Figura 01: Número estimado de pessoas com diabetes no mundo e por região em 2015 e estimativa para o ano 2040. Fonte: IDF (2015)

2.2 CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES MELLITUS

A maioria dos casos de DM está incluindo em duas principais categorias classificadas de acordo com a etiologia. O DM1, cuja causa é uma deficiência na secreção da insulina, e o DM2, sendo a categoria mais prevalente, cuja causa é a combinação da resistência a insulina e uma resposta compensatória da secreção de insulina inadequada (SATO; IWAMOTO, 2013).

2.2.1 Diabetes Mellitus tipo 1

O DM1 é uma doença autoimune decorrente da destruição das células β pancreáticas resultando em uma deficiência de insulina ou ainda, na ausência de evidências de processo autoimune, referida como idiopática. É considerada

uma doença de etiologia múltipla, onde há a associação de fatores, genéticos, ambientais e imunológicos (KATSAROU et al., 2017).

O DM1 afeta indivíduos geneticamente susceptíveis, os quais apresentam marcadores de autoimunidade como os autoanticorpos anti-insulina, antidescarboxilase do ácido glutâmico e antitirosina-fosfatases. Esses anticorpos podem estar presentes meses ou anos antes do diagnóstico clínico em até 90% dos indivíduos quando é detectada a hiperglicemia. Além do comportamento autoimune, o DM1 apresenta intensa associação com determinados genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA), sobretudo os de classe II DR3, DR4 e DQ, responsáveis por 40% do componente genético desta doença crônica. As manifestações clínicas do DM1, no entanto, só se tornam evidentes tardiamente quando já ocorreu o comprometimento de cerca de 90% das células beta pancreáticas (LAMPASONA; LIBERATI, 2016; POCIOT; LERNMARK, 2016; WANG et al., 2017).

A doença afeta predominantemente crianças e adolescentes, com o pico de início entre 11 e 12 anos de idade. Esse fato é corroborado pela taxa de prevalência elevada, já que o DM1 é descrita como a segunda doença crônica mais frequente nessa faixa etária, sendo superada apenas pela asma. Além disso, o DM1 é considerado uma das doenças hereditárias mais comuns (KATSAROU et al., 2017; WANG et al., 2017). Em relação a incidência, o DM1 tem grande variabilidade, sendo encontrada uma taxa bastante elevada em países com descendência caucasiana, como a Finlândia (40 casos/ 100.000 nascimentos/ano) ao passo que em países asiáticos as taxas são significativamente menores (inferiores a 3/100.000 nascimentos/ano) (DELLA MANNA et al., 2016). No Brasil os dados disponíveis estimam em 7,6 indivíduos afetados em 100.000 nascimentos/ano (FERREIRA et al., 1993; LISBÔA et al., 1998).

2.2.2 Diabetes Mellitus tipo 2

O DM2 é o tipo mais prevalente da doença e sua causa é uma combinação de resistência à ação da insulina e uma resposta compensatória inadequada da secreção desse hormônio. O diagnóstico, na maioria dos casos,

é feito a partir dos 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo. Abrange de 85% a 90% do total de casos de DM (LAWLOR et al., 2017).

Considerado o principal problema de saúde pública, devido ao aumento no risco de doenças cardíacas, derrames e complicações microvasculares como cegueira, insuficiência renal, neuropatia periférica. A mudança do estilo de vida, incluindo alterações de hábitos alimentares, como por exemplo, a ingestão de alimentos calóricos em excesso (gorduras e carboidratos), e a diminuição de atividade física têm sido indicativos de causa do aumento da doença, sendo possível caracterizá-la como pandêmica (ADA, 2014).

Os fatores genéticos exercem forte influência no desenvolvimento do DM2, sendo atualmente descritos na literatura, em torno de 320 genes de susceptibilidade à doença para o organismo humano (ALI, 2013). Nos últimos sete anos, estudos de ligação e avaliação do genoma completo caracterizaram, aproximadamente, 175 novos genes com predominância de variações nucleotídicas pontuais (SNPs – *single nucleotide polymorphisms*). A diversidade de SNPs em regiões não-codificadores desses genes, individualmente, possuem efeito irrisório no mecanismo da doença, entretanto, em conjunto, a somatória da expressão simultânea de diversos genes pode contribuir com a susceptibilidade ao DM2 (GRARUP et al., 2014; MORRIS et al., 2012; PRASAD; GROOP, 2015).

Como exposto, há uma grande diversidade de genes influenciando o desenvolvimento do DM2, a maioria deles está envolvido na alteração da função, desenvolvimento e regulação da massa de células β (LAWLOR et al., 2017). Outros grupos de genes estão associados indiretamente ao DM2, envolvidos com a predisposição à obesidade, altos níveis de colesterol total, LDL, baixo nível de HDL, dentre outros fatores, cujas atividades acarretam alterações no processo de secreção da insulina (GRARUP et al., 2014).

2.2.3 Diabetes Mellitus gestacional

O DM gestacional (DMG) é uma desordem heterogênea caracterizada pela intolerância aos carboidratos, intolerância à glicose, hiperglicemia em variados graus de intensidade, com início ou diagnosticada pela primeira vez durante a gestação (ADA, 2014). A hiperglicemia é o distúrbio metabólico mais comum que complica as gestações em todo o mundo, cerca de uma em cada

sete mulheres (14%) tem a gravidez complicada pela hiperglicemia (SACKS et al., 2012). No entanto, essa percentual de gestantes afetadas varia de 1 a 14%, dependendo da população estudada e dos critérios diagnósticos empregados, resultando em mais de 200.000 casos anualmente (ADA, 2014; CHEUNG; BYTH, 2003; IDF, 2015).

O DMG e o DM2 compartilham de fisiopatologia similar, os estudos mostram que muitas variações genéticas que aumentam os riscos de sobrepeso, obesidade, inflamação, hiperglicemia e DM2 são também associadas ao DMG, sugerindo um fundo genético comum a estas duas condições e que defeitos tanto na secreção quanto na ação da insulina também são cruciais para o desenvolvimento do DMG (BAJAJ; GROSS, 2015; LOWE et al., 2016; YAN; YANG, 2014). Além disso, o DMG é recorrente em pelo menos 30% das mulheres com antecedente de diabetes gestacional em gravidezes anteriores, sugerindo que há um subgrupo de mulheres que podem ser geneticamente predispostas a desenvolver o DMG (BAJAJ; GROSS, 2015).

2.3 PATOGÊNESE DO DIABETES MELLITUS

O DM1 é uma doença de evolução lenta com desenvolvimento progressivo ao longo dos anos, caracterizando a fase pré-clínica da doença. Os estudos apontam que, no período de manifestação da doença, mais de 90% das células secretoras de insulina já foram destruídas, estando em alguns casos, praticamente ausentes (CAMPBELL-THOMPSON et al., 2013).

O DM1 é caracterizado pela destruição autoimune das células β pancreáticas, apresentando aspecto genético complexo, com múltiplos genes envolvidos. O percentual de concordância em gêmeos monozigóticos (30 a 50%), bem como, um baixo risco de irmãos desenvolverem simultaneamente este tipo de diabetes, refletem o papel genético e ambiental na etiologia do DM1 (CÁRDENAS-ROLDÁN et al., 2013). Uma ampla variedade de marcadores, como os anticorpos anticélulas das ilhotas (I-CAs), anti-insulina (IAAs), antiácido glutâmico descarboxilase (GAD-56) e antitirosina fosfatases IA-2 e 1A-2B, estão relacionados com o desenvolvimento do DM1. Geralmente, pelo menos um desses marcadores é encontrado em 85-90% dos indivíduos com hiperglicemia em jejum, observada no início da doença (CANIVELL; GOMIS, 2014; DELLA MANNA et al., 2016).

A patogênese do DM1 se inicia após o estímulo de fatores genéticos e ambientais. A apresentação de auto-antígenos específicos das células β pelas células apresentadoras de antígenos (APC) a células Th0 em associação com moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II, do inglês: *Major Histocompatibility Complex class II*), é considerado o processo inicial da doença. Os macrófagos e células dendríticas secretam IL-12 que promove a diferenciação das células Th0 em Th1 (MAUVAIS; DIANA; VAN ENDERT, 2016; ZIEGLER; NEPOM, 2010).

A ação destes fatores provoca o aumento da produção de interferon gama (IFN- γ) e do MHC-I, expondo as células β pancreáticas ao ataque das células T CD8⁺ autorreativas. Posteriormente, as células β liberam auto-antígenos que estimulam a perforina, fator de necrose tumoral (TNF- α) e IFN- γ , que beneficiam a resposta das células T efetoras sobre a função das células T regulatórias (Treg). Este evento, inicia a conversão das células B em plasmócitos, via células T CD4⁺, e conseqüentemente ocorre a produção de auto-anticorpos. O processo imune e inflamatório, desencadeado na ilhota pancreática, culmina com a destruição das células β em razão de um infiltrado de linfócitos mononucleares, macrófagos e células *natural killer*, configurando o quadro de insulite. Como consequência desse processo, instala-se a hiperglicemia devido à deficiência da secreção de insulina (Figura 02) (BELLE; COPPIETERS; HERRATH, 2011).

O DM2 é um dos tipos mais complicados e prevalentes do diabetes (IDF, 2015). Diversas propostas e hipótese têm sido sugeridas para descrever os mecanismos, que são normalmente associados com a propagação do DM2 (HALBAN et al., 2014; KWON; PESSIN, 2013). Obesidade, envelhecimento, disfunção das células β , acúmulo lipídico nos órgãos, estresse oxidativo, inflamações teciduais e sedentarismo são os fatores de risco mais conhecidos para a ligação com a resistência à insulina e, subsequente, progressão no DM2 (LEY et al., 2014; TANGVARASITTICHA, 2015). Curiosamente, além desses fatores, os participantes autoimunes que causam a inflamação também estão sendo associados como participantes na resistência à insulina pois, afetam as células β das ilhotas pancreáticas (GRANT; DIXIT, 2013).

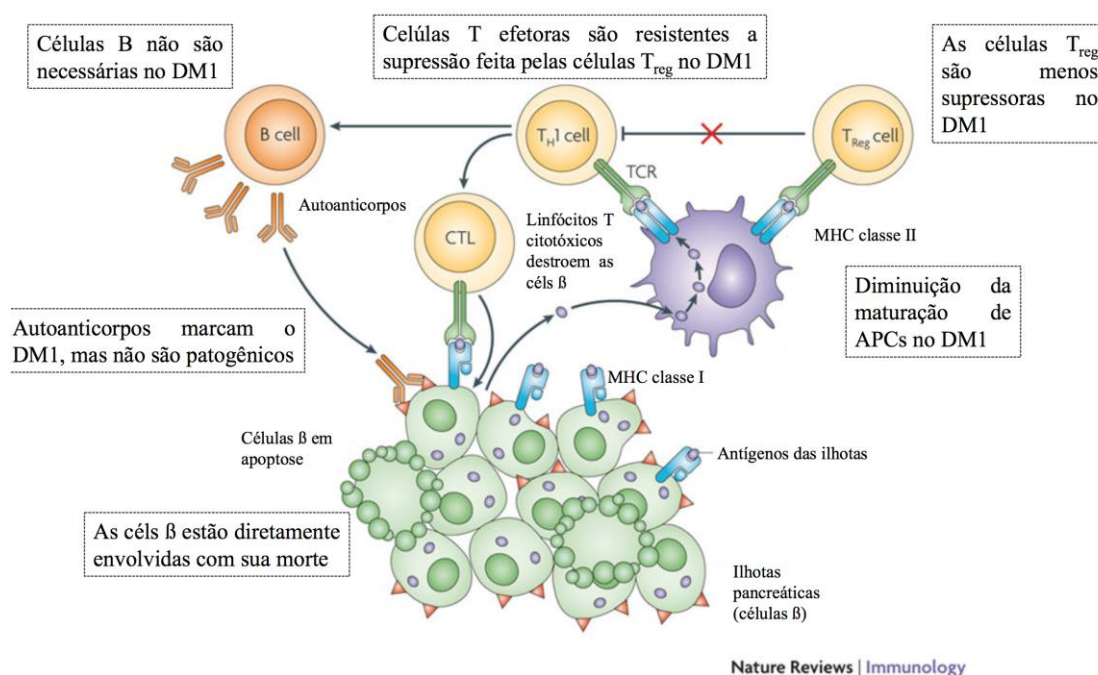


Figura 02: Os principais componentes envolvidos no processos que leva a destruição das células no DM1. **Fonte:** Adaptado de Roep&Peakman (2010).

No DM2, o principal fenômeno fisiopatológico é a resistência à ação da insulina, diminuindo a captação de glicose em tecidos insulino-dependentes, entretanto, outros fenômenos importantes para o estabelecimento da doença são conhecidos, como por exemplo, a desregulação da produção hepática de glicose. No início da doença, em resposta a esta resistência, ocorre a hiperinsulinemia compensatória, onde as ilhotas pancreáticas aumentam a sua massa celular e a secreção da insulina (Figura 03). Entretanto, quando essas células tornam-se incapazes de compensar a resistência à insulina, a deficiência de insulina ocorre nos tecidos periféricos, o que culmina no desenvolvimento do DM2. Uma vez que o DM2 inicia, ocorre o aumento das consequências clínicas a longo prazo, que podem incluir aterosclerose, neuropatia, retinopatia e nefropatias (DONATH; SHOELSON, 2011; IDF, 2015).

Embora, como mencionado anteriormente, existam muitos fatores patogênicos envolvidos no DM2, a avaliação de qual mecanismo está envolvido entre os diferentes tecidos é particularmente difícil, no entanto, é importante ressaltar que todos os mecanismos responsáveis pelo estresse celular se sobrepõem e provocam a inflamação do tecido pancreático (DONATH et al., 2009; DONATH; SHOELSON, 2011). O DM2 é caracterizado pela secreção de insulina desregulada e seus efeitos relacionados, em termo

de patogênese, a glucolipotoxicidade pode ser declarada como um dos fatores essenciais do DM2. Sendo esta, um termo comum utilizado em combinação para a glucotoxicidade e a lipotoxicidade, já que, ambos progridem simultaneamente (FU; R. GILBERT; LIU, 2013).

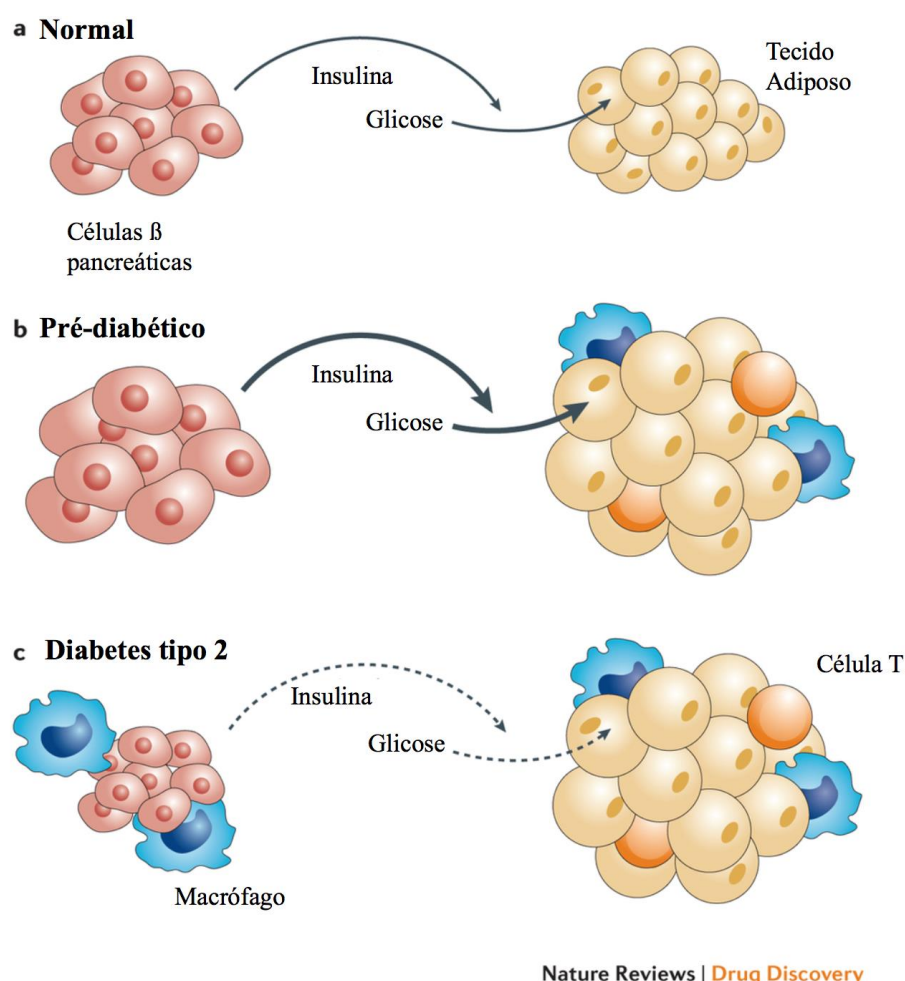


Figura 03: O desenvolvimento do diabetes tipo 2. **Fonte:** Adaptado de Donath (2014)

2.4 IMUNOGENÉTICA DO DIABETES MELLITUS

O sistema imune desempenha um papel central no estabelecimento do DM1, quatro décadas de estudos sobre essa doença têm demonstrado que genes relacionados com o sistema imune, especificamente, àqueles responsáveis por codificar as proteínas do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *Human Leucocyte Antigens*); conferem o maior risco genético para a doença. Os haplótipos do gene HLA classe II, *HLA DR* e *DQ*, são reconhecidos como importantes marcadores de susceptibilidade ao DM1 (ERLICH et al., 2008; NOBLE, 2015).

O efeito do locus HLA no risco do DM1 é provavelmente devido à apresentação inadequada de auto-antígenos para o linfócito durante o seu processo de maturação no timo, levando à ineficiente deleção dos linfócitos auto-reativos. Em concordância com esta hipótese, a expressão transgênica dos alelos de risco da classe II do sistema HLA em camundongos sensibiliza o sistema imune para auto-antígenos da célula β -pancreática (YANG; SANTAMARIA, 2006). Com o advento dos estudos de associação humana (*Genome-Wide Association studies – GWAs*), aliado aos avanços tecnológicos de genotipagem e ao conhecimento do genoma humano, foi possível a realização de análises estatisticamente robustas que permitiram identificar novos genes relacionados com o DM1 que não estão localizados no locus HLA (POCIOT; LERNMARK, 2016). Esses genes estão envolvidos, basicamente, em três categorias gerais de atuação: função imune (engloba a maioria dos genes), expressão da insulina e função da célula β -pancreática (NOBLE, 2015).

Estudos mais recentes de mapeamento genético e de gene-fenótipo descrevem possíveis origens para o DM1 através da indicação de vias biológicas potencialmente relevantes na doença, como por exemplo as vias de resposta ao stress e a inflamação (BRORSSON et al., 2010). A maioria dos genes candidatos para o DM1 são expressos nas ilhotas pancreáticas, sugerindo que eles regulam ao menos parte dos mecanismos patogênicos a nível de células β . Além disso, outros estudos apontam que alguns destes genes candidatos regulam a inflamação pancreática e a apoptose dessas células (NOBLE, 2015; SANTIN; EIZIRIK, 2013).

No que diz respeito ao DM2, fatores genéticos e ambientais estão envolvidos na patogênese da doença. A importância da hereditariedade no DM2 se apoia em vários fatos, entre os quais: a) a concordância entre gêmeos monozigóticos para o DM2 é de 50 a 80%, sendo muito superior à observada em gêmeos dizigóticos (menos de 20%); b) estudos epidemiológicos demonstram haver uma grande variação na prevalência do DM2 em diferentes grupos étnicos, desde valores baixos como 1% em algumas populações orientais até cerca de 50% em grupos isolados como os índios Pima do Arizona; c) resultados positivos de numerosos estudos genéticos (*HNF1A*,

HNF1B, *PPARG* e etc.) (ALI, 2013; GRARUP et al., 2014; PRASAD; GROOP, 2015).

O DM2 se apresenta nas famílias como um cluster genético, sendo considerado hereditário. O risco relativo de parentes de um indivíduo com DM2 desenvolverem a doença, quando comparado com famílias onde a doença não é encontrada, é de aproximadamente 2 a 3, entretanto esse número aumenta para 30 caso dois irmãos sejam portadores da doença. O risco em desenvolver o DM2 é maior se a mãe for diabética tipo 2, quando comparado se o pai é portador da doença (ALMGREN et al., 2011; HEMMINKI et al., 2010).

A identificação de genes responsáveis pelo desenvolvimento de doenças poligênicas complexas, como por exemplo o DM2, têm sido um desafio. Entretanto, a diferença nessa identificação aconteceu em 2007 com os estudos de associação GWAS que relataram variantes genéticas comuns associadas ao DM2. Um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no *TCF7L2* possui a associação mais forte com o DM2, entretanto SNPs em outros genes também têm sido associados com o DM2, incluindo *SLC30A8*, *CDKAL1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *HHEX*, *IGF2BP2*, *GCKR* entre outros (FUCHSBERGER et al., 2016; GRARUP et al., 2014; LYSENKO et al., 2007; SAXENA et al., 2007)

2.5 AS CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas (DC), conhecidas normalmente como células apresentadoras de antígeno (APC), desempenham um papel fundamental na modulação da resposta imunológica. Estas células caracterizam-se pela capacidade de captar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T; são consideradas as APCs mais eficientes em ativar os linfócitos T (MBONGUE et al., 2017).

As DCs foram observadas pela primeira vez na pele em 1868, por Paul Langerhans, tendo sido batizadas com o seu nome e erroneamente consideradas células nervosas cutâneas. Mais de um século depois, em 1973, Ralph Steinmann e Zanvil Cohn descobriram estas células em suspensões celulares do baço de ratos e, com base na sua morfologia peculiar caracterizada por prolongamentos ou dendritos, designaram-nas “células dendríticas” (STEINMAN; COHN, 1973; ZHOU; WU, 2017).

As DCs se originam na medula óssea a partir da célula-tronco hematopoiética pluripotente que, por diferenciação sucessiva, dá origem ao monócito. Este, por sua vez se diferencia em célula dendrítica imatura no tecido epitelial e, após o processo de maturação, migra para os linfonodos. As DCs em seu estado imaturo estão localizadas em tecidos periféricos, particularmente em locais de interface com o meio externo, tais como a pele e mucosa, onde formam um sistema de vigilância que tem como objetivo detectar e capturar antígenos externos. As DCs imaturas expressam receptores de membrana que se ligam aos antígenos: receptores de manose que atuam na ligação e ingestão de microrganismos e receptores *Toll* que atuam na ativação de fagócitos e resposta a diferentes tipos e componentes celulares (AUDIGER et al., 2017; AUSTYN, 2016; QUINTANA, 2017).

Após a interação com o antígeno, as DCs migram, de modo seletivo, dos tecidos periféricos para os órgãos linfoides secundários, onde interagem com os linfócitos T, ativando-os e desencadeando a resposta imunológica. Durante este percurso, ocorre o processo de maturação, no qual as DCs processam o antígeno e o apresentam à sua superfície, associado a moléculas do MHC. Neste processo, as DCs sofrem modificações fenotípicas e funcionais, tais como a perda da capacidade de captar e processar antígenos e o aumento da expressão de moléculas acessórias (WORBS; HAMMERSCHMIDT; FÖRSTER, 2016). O processo de maturação das DCs consiste em uma série de mudanças fenotípicas que estão ligadas ao aumento da capacidade de processar antígenos e ativar os linfócitos. Essas mudanças incluem aumento da expressão de complexos peptídeo – MHC, aumento da expressão de CD48 e CD58 que favorecem a ligação a células T, além de aumento de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86, produção de quimiocinas, citocinas como IL-12 e interferons do tipo I (GUILLIAMS et al., 2014; SCHLITZER; MCGOVERN; GINHOUX, 2015).

As alterações descritas acima permitem que haja a apresentação dos antígenos as linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, induzindo-os à desenvolverem uma resposta específica. Esse processo pode modular a atividade das células T auxiliaadoras do tipo I e II, ação citotóxica das células T CD8⁺, produção de anticorpos por linfócitos B, memória imunológica, ativação de células *natural killers*, dentre outros. Já na ausência desses sinais de perigo as DCs induzem

tolerância. Esta se dá ativando linfócitos T reguladores e também induzindo a proliferação de células T CD4⁺ não responsivas. Dessa maneira, as DCs participam do processo de tolerância imunológica, prevenindo ataques contra o próprio organismo (WORBS; HAMMERSCHMIDT; FÖRSTER, 2016).

Classicamente, as DCs são derivadas de células tronco hematopoiéticas que possuem duas origens: i) diferenciadas a partir de precursores mielóide (mDC) as quais expressam CD11c e ii) diferenciadas a partir de precursores linfóides (pDC) que são CD123⁺. As DCs derivadas dos precursores mielóides CD34⁺/CD13⁺ podem ser classificadas em dois tipos de subpopulações diferentes, as CD1a⁺ e as CD14⁺. As células CD1a⁺, conhecidas como células de Langerhans, caracterizam-se por ter grânulos no citoplasma e estão localizadas na epiderme; já as células CD14⁺ possuem a capacidade de se diferenciar em mDC e não apresentam grânulos. As pDC são de origem linfóide e estão presentes na circulação sanguínea e nos órgãos linfóides secundários, entretanto, as mDCs podem ser diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos obtidos de células mononucleares de sangue periférico estimulados com as citocinas GM-CSF e IL-4 (AUSTYN, 2016; MILDNER; JUNG, 2014).

2.5.1 Reconhecimento de patógenos pelas DCs

O reconhecimento dos diferentes microrganismos pelas APCs, como as DCs, é feito por receptores expressos em sua membrana que interagem com padrões moleculares presentes em patógenos (PAMPs) como lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (PULENDRA, 2015). Dentre estes receptores estão os do tipo *Toll* (TLRs) e receptores de lectina tipo C (CLRs) que ligados seletivamente, geram sinais intracelulares de ativação e maturação celular, seguida de produção de mediadores solúveis e aumento da expressão de moléculas coestimuladoras os quais podem determinar, durante a apresentação antigênica, a polarização dos linfócitos T CD4⁺ para Th1, Th2, Th17 ou Treg (AUSTYN, 2016; ENGERING et al., 2002; GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2016; VAN KOOYK; GEIJTENBEEK, 2003).

2.5.2 Papel das DCs no Diabetes *Mellitus*

As DCs, atuam no sistema imunológico pela apresentação de partículas antigênicas para os linfócitos T, podendo assim induzir uma resposta imune, gerar tolerância ou criar a memória imunológica (GANGULY et al., 2013). A captura de antígenos pode ocorrer por fagocitose, macropinocitose e endocitose onde o antígeno será processado e apresentado em moléculas de MHC na superfície celular. A constante migração de células imaturas para os linfonodos e a apresentação de antígenos próprios na superfície celular constituem elementos importantes na manutenção da tolerância (HESPEL; MOSER, 2012).

As DCs promovem uma conexão entre o sistema imune inato e o adaptativo (STEINMAN, 2012) através de três sinais, onde o primeiro sinal é constituído pela ligação do complexo MHC:peptídeo ao receptor de células T (TCR). O segundo sinal é estabelecido através da expressão de moléculas coestimuladoras na superfície das DCs e ligação destes a receptores específicos encontrados nos linfócitos T. Por fim, o terceiro sinal é feito por mediadores solúveis como IL-12, TNF- α , IL-6 e IL-15, também importantes para a ativação de células T *naive* (HUBO et al., 2013).

Em determinadas condições, o sistema imune pode sofrer falhar comprometendo o sistema de proteção, que pode ser alterado pelo aumento na proliferação ou deficiência de alguns componentes. Essa desregulação pode direcionar o sistema imune a responder contra o próprio organismo, ou seja, afetar o mecanismo de tolerância, contribuindo para o surgimento da autoimunidade. Esse mecanismo é uma propriedade fundamental do sistema imunológico normal, pois atua na destruição ou inativação de linfócitos que reconhecem antígenos próprios (KUHN et al., 2016).

Em contraste as DCs encontradas nos outros órgãos linfóides, as DCs do timo possuem uma alta capacidade de apresentação de antígenos, sendo ainda, apta a apresentar antígenos a células T CD8⁺ na ausência de perigo ou sinais inflamatórios. A destruição das células β pancreáticas no DM1 é desencadeada pela infiltração de linfócitos T autorreativos, a falha na tolerância é mediada por células linfocitárias, macrófagos, células dendríticas e *natural killer*, que irão infiltrar-se nas ilhotas pancreáticas, destruindo as células β produtoras de insulina, provocando um processo inflamatório denominado de

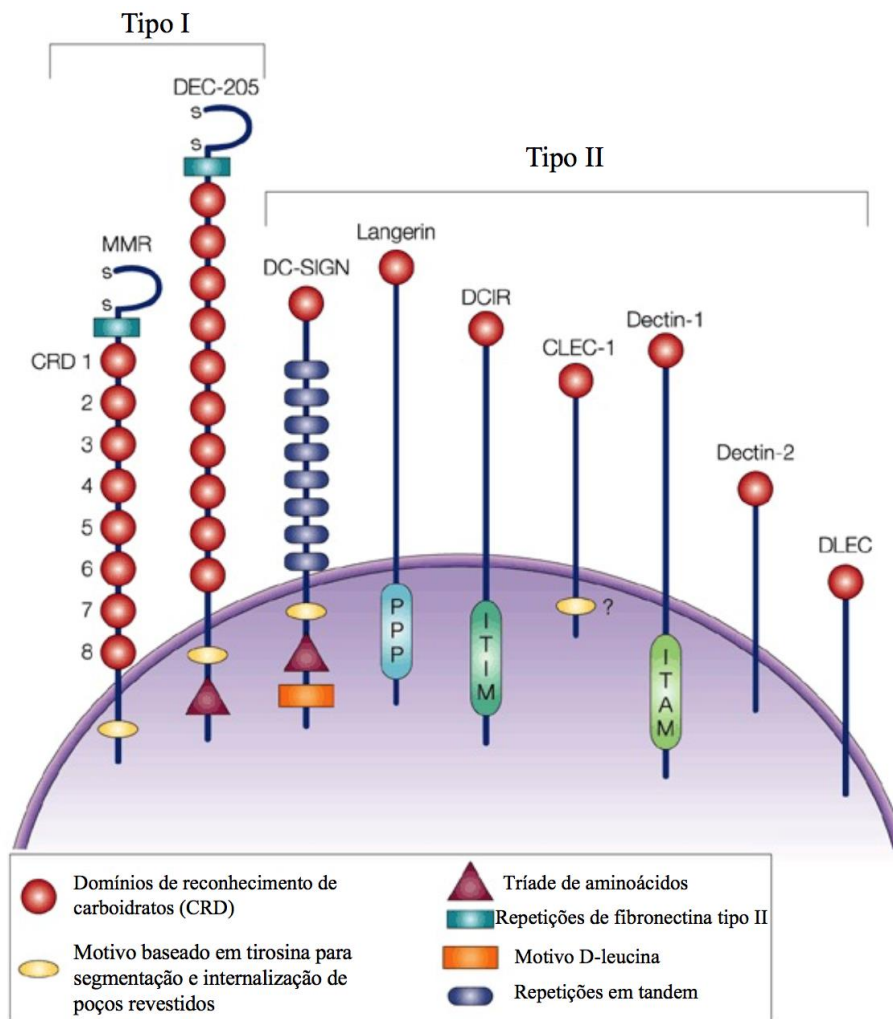
insulite (GUERDER et al., 2013; LEE, 2011; MAUVAIS; DIANA; VAN ENDERT, 2016).

2.5.3 Receptores de lectina tipo C

Dentre outros receptores expressos em APCs e DCs, os CLRs podem participar da adesão célula-célula, migração celular bem como reconhecimento tanto de antígenos próprios como de patógenos contendo oligossacarídeos na sua composição. Além disso, apresenta papel relevante na maturação das APCs e, portanto na geração da resposta imune específica (DAMBUZA; BROWN, 2015; DRICKAMER; TAYLOR, 2015; HOVING; WILSON; BROWN, 2014).

Todos os CLRs possuem sítio de interação com glicanos denominado domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e dependendo de sua sequência de aminoácidos, o CRD apresenta especificidade para uma ou outra estrutura contendo resíduos de manose, fucose, galactose, N-AcetilGlucosamina, N-AcetilGalactosamina (Figura 04) (ENGERING et al., 2002).

Apesar do reconhecimento dos CLRs indicar redundância na interação com as diferentes estruturas glicanas observa-se maior afinidade ou seletividade na interação entre esses receptores e determinados monossacarídeos nas cadeias presentes em patógenos. O reconhecimento via CLRs leva à internalização do patógeno, sua degradação e apresentação antigênica (JOSHI et al., 2011; VAN LIEMPT et al., 2006). A sinalização pelos CLRs pode ser mediada por duas vias principais, sendo uma delas por moléculas adaptadoras contendo ITAMs (*tyrosine-based activation motif*) e outra via dependente de proteínas quinases ou fosfatases que diretamente ou indiretamente interagem com seus domínios citoplasmáticos (DAMBUZA; BROWN, 2015; GEIJTENBEEK; GRINGHUIS, 2016).



Nature Reviews | Immunology

Figura 04: Tipos de moléculas CLRs encontradas nas células dendríticas. Receptores de lectinas tipo C são divididos em dois tipos (I e II), de acordo com o seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e são importantes para a captura de antígeno. **Fonte:** Adaptado de Fidgor, Van Kyook e Adema (2002).

2.5.4 DC-SIGN

O DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-integrin*), também conhecido como CD209, funciona como um receptor de adesão envolvido na migração das DCs, assim como, na interação DC com as células T. Além disso, esse receptor é responsável por mediar o rolamento endotelial e emigração das DCs do sangue para os tecidos periféricos e órgãos linfóides secundários (GEIJTENBEEK et al., 2000). No interior dos órgãos linfóides, o DC-SIGN, estabelece o contato inicial entre as DCs e as células T com o intuito de promover o escaneamento do peptídeo MHC realizado pelos receptores da célula T (TCR), demonstrado na Figura 05

(ZHANG; REN; ZUO, 2014). O reconhecimento de patógenos pelo DC-SIGN, determina o tipo de resposta imune adaptativa que irá acontecer, através da modulação de vias de sinalização induzidas por outros receptores e, com isso, promovendo a adaptação da resposta imune aos diferentes patógenos (JOSHI et al., 2011).

O DC-SIGN é um receptor dependente de cálcio que possui três domínios: região N terminal localizada no citoplasma, região transmembrana e região C terminal (extracelular) muito conservada que possui uma lectina que irá interagir com as glicoproteínas dos patógenos (DOS SANTOS et al., 2017; ZHANG; REN; ZUO, 2014). O DC-SIGN é capaz de ligar-se a moléculas de manose e fucose, e menos especificamente, a estruturas de N-acetilglucosamina (VAN LIEMPT et al., 2006).

Em um nível genômico, o DC-SIGN é codificado pelo gene *DC-SIGN*, que está localizado no cromossomo 19p13.3 e possui 6 éxons, sendo regulado pelo fator de transcrição PU.1 em combinação com o MYB ou com o RUNX3, o que confere a expressão do gene. Eventos complexos de splicing alternativos no pré-RNA do *DC-SIGN* origina uma matriz de transcritos que codificam cinco grupos de isoformas da proteína final DC-SIGN. Essas isoformas incluem associação de membrana, formas solúveis e truncadas do DC-SIGN (MUMMIDI et al., 2001).

O gene possui diferentes polimorfismos de base única (SNPs) que afetam a sua expressão, como por exemplo, os SNPs na posição -871 (rs735239 G>A) e -336 (rs4804803 A>G), localizados na região promotora do *DC-SIGN* (ZHU et al., 2010). Devido a sua alta densidade de variações em sua estrutura vários estudos têm analisado o papel dos polimorfismos nesse gene e sua relação com doenças infecciosas e autoimunes (CAI et al., 2015; DA SILVA et al., 2014; QU et al., 2015; ZHU et al., 2010). Estudos de predição da expressão gênica baseados em polimorfismos revelaram que o rs735239 afeta a ligação do fator de transcrição Oct-, onde o alelo polimórfico 'A' tem sido predito como responsável por eliminar o sítio de ligação para esse fator, diminuindo assim a expressão do *DC-SIGN*. No polimorfismo rs4804803 o alelo polimórfico 'G' é descrito como modificador do sítio de ligação para o fator de transcrição Sp-1, sendo esse alelo responsável por criar um novo sítio onde o

fator de transcrição irá se ligar aumentando assim a expressão gênica (ALAGARASU et al., 2013; SAKUNTABHAI et al., 2005).

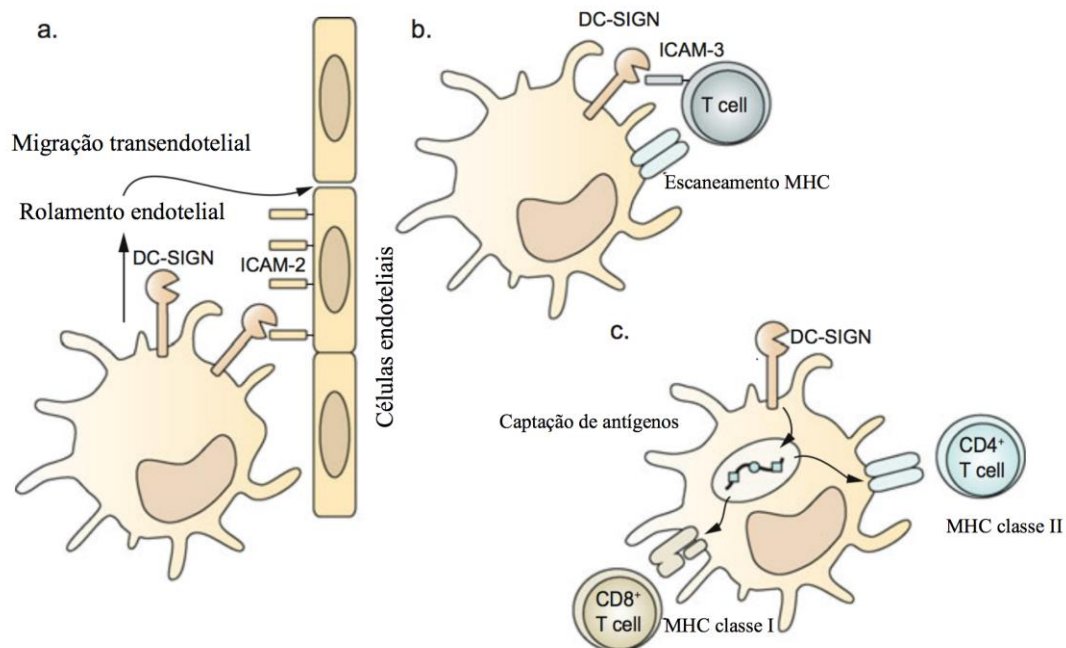


Figura 05: **Função do DC-SIGN na migração das DCs, respostas da célula T e processamento do antígeno.** (a) pré-DCs são originadas na medula óssea e circulam pelo sangue periférico antes da migração para os tecidos periféricos e reconhecimento dos antígenos (b) nas estruturas linfóides, as DCs apresentam os antígenos, em moléculas MHC classe I ou II, para os linfócitos T induzindo assim a resposta imune adaptativa (c) as DCs são células profissionais de apresentação de antígenos, sendo necessária a internalização e processamento dos mesmos para posterior apresentação aos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. **Fonte:** Adaptado de Sprokholt et al. (2016)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão do gene *CD209* em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 1 e 2 e se a glicose é capaz de estimular a expressão deste gene em cultura celular de células dendríticas (DCs) diferenciadas a partir de PBMCs humanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar os níveis de expressão *ex-vivo* do gene *CD209* entre os grupos de pacientes portadores de DM1 e DM2 e em controles saudáveis;
2. Avaliar a influência dos polimorfismos genéticos (rs735239 e rs4804803) na expressão do *CD209* nos grupos de pacientes com DM1 e DM2;
3. Analisar a resposta celular através da expressão gênica do *CD209* frente à estimulação de glicose e mimetizador de patógeno em cultura de células dendríticas.
4. Comparar a expressão gênica do gene *CD209 in vitro*, em culturas genótipo-guiadas para os SNPs funcionais rs735339 e rs4804803, de células dendríticas após o estímulo com glicose e LPS;

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO E GRUPO AMOSTRAL

Trata-se de um estudo retrospectivo do tipo caso-controle. A amostra foi constituída por pacientes portadores do diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2) e o grupo controle constituído por indivíduos saudáveis. Elegeu-se para o estudo 79 indivíduos, de ambos os gêneros, com idades entre 8 e 80 anos. Desses indivíduos, 37 são diabéticos do tipo 1 com idade variando de 8-17 anos, 18 são diabéticos do tipo 2 com idade variando de 50-80 anos; e, 24 são indivíduos saudáveis com idade entre 23-87 anos. Os indivíduos portadores do DM foram selecionadas de acordo com os critérios de classificação da *American Diabetes Association* (2011), no serviço de referência em endocrinologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco e do Instituto Professor Fernandes Figueira (IMIP), sendo o grupo controle formado por indivíduos saudáveis sem histórico de doenças autoimunes. O projeto possui autorização do comitê de ética do Instituto Professor Fernandes Figueira com os protocolos 1717/2010 e foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal (CEP/CCS/UFPE nº513/11).

4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram obtidos 12mL de sangue em tubo de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 1,8mg/mL de sangue), mantidos sobre refrigeração até o momento da utilização para o isolamento de RNA e de células mononucleares. Ambos os isolamentos foram realizados no mesmo dia da coleta, e todas as etapas foram realizadas no setor de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e no setor de Cultura de Células do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Fiocruz) localizados no interior da Universidade Federal de Pernambuco.

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA DE SANGUE TOTOAL PERIFÉRICO DE PACIENTES E CONTROLES

O ácido nucléico RNA foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA), durante as etapas de processamento, após a adição do clorofórmio (EMSURE®), o RNA permanece na fase aquosa, sendo obtido por precipitação em isopropanol (EMSURE®).

Em todas as amostras, foi utilizado 750 µL de TRIzol® a cada 250 µL de sangue, com intensa pipetagem para estimular a lise das células e homogeneização da solução. Após o período de 10 minutos de incubação, à temperatura ambiente, foram adicionados 150 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 15 segundos e incubados em temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram submetidas à centrifugação à 12000 g por 15 minutos a 4°C, após a centrifugação, a solução apresentou-se separada em uma camada inferior vermelha (fase de fenol/clorofórmio), uma interfase e uma fase aquosa incolor na porção superior. A fase aquosa, na qual o RNA está presente, foi transferida para um microtubo de 1,5 mL sendo adicionado, posteriormente, 375 µL de isopropanol para a precipitação do RNA. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 10 minutos e, então, submetidas à centrifugação a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado ao *pellet* de RNA 750 µL de etanol 75%. As amostras foram submetidas a suave agitação, para promover a remoção de reagentes da molécula de RNA, e posterior centrifugação a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente durante 10 minutos para secagem. Foi adicionado 35 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Ambion®) com seguinte incubação dos microtubos durante 10 minutos a 55°C e estocagem a -80°C.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA TOTAL DE SANGUE PERIFÉRICO

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado pela leitura em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Life Technologies) nos

comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da análise da relação entre as leituras em 260 e 280 nm, sendo a razão próxima a 2, geralmente, utilizada para classificar uma amostra de RNA como livre de contaminantes nocivos à amplificação *in vitro*. No presente estudo, todas as amostras apresentaram razão entre 1,80 e 2,0.

4.5 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE DCS A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO

Monócitos foram separados de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidos de 09 indivíduos sadios, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Em um tubo contendo 8 mL de solução salina (1X) 8 mL de sangue foi homogeneizado, posteriormente, essa solução foi transferida para um tubo de 50 mL contendo 8 mL de Ficoll-Paque®. O tubo foi centrifugado a 400 x *g* por 35 minutos a 19°C, sendo as células mononucleares transferidas para outro tubo, onde foi adicionado meio de cultura RPMI-1640, seguindo-se a centrifugação de 200 x *g* por 10 min a 19°C. O sobrenadante foi removido, as células foram lavadas em meio RPMI e centrifugadas a 100 x *g* por 10min, tal etapa foi repetida mais duas vezes. Ao final desta etapa, o rendimento foi de aproximadamente 1×10^8 células.

As células dendríticas foram obtidas segundo Sallusto & Lanzavecchia (1994). As células mononucleares foram colocadas em garrafa de 25 mL e incubadas por 2h a 37°C. As células não-aderentes foram desprezadas e as aderentes cultivadas por sete dias em meio de cultura RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF) e 5% do antibiótico penicilina, para estimular a diferenciação em CDs foram utilizados os estímulos GM-CSF (50ng/mL) e IL-4 (50ng/mL). No 3º e 5º dias de cultura, 50% do meio foi retirado, completando-se com meio RPMI suplementado, e adicionando os estímulos de diferenciação. No 6º dia de cultura retirou-se 100% do meio, adicionando-se então 10mL de meio novo e suplementando a garrafa, acrescentou-se LPS (500ng/mL) a fim de promover a ativação das células dendríticas.

4.6 TRIPSINIZAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS E ENSAIOS DE TRATAMENTO

No 8º dia foi realizado o protocolo de tripsinização, que consiste da adição de tripsina para que ocorra o rompimento das junções entre as células e estas se soltem do fundo da garrafa. Para isso, o meio de cultivo da garrafa foi descartado, e adicionado 3 mL de tripsina (solução de tripsina a 0,05%), sendo a garrafa levada para a estufa de cultivo a 37°C durante 2 minutos, para que as células se soltassem do fundo da garrafa. Com a observação do início do desprendimento da camada de células dendríticas das garrafas, visualizada em microscópio invertido, as garrafas foram submetidas a suave agitação para facilitar o desprendimento das células aderidas. Para inativar a ação da tripsina, foi utilizado o volume de 6 mL de meio RPMI contendo 5% de SFB, com homogeneização cuidadosa da suspensão celular e centrifugação a 200 x *g* por 6 minutos a 19°C. Após a centrifugação, o sobrenadante celular com resíduos de tripsina foi descartado e as células ressuspendidas em 7 mL de meio de cultivo, sendo o procedimento de lavagem das células realizado duas vezes.

Após a ressuspensão, uma alíquota das células foi corada com azul de Trypan que cora em azul as células mortas, sendo realizada a contagem do número de células por mL com o auxílio da câmara de Neubauer. Após o estabelecimento do número de células, foi realizada a passagem para placas de seis poços com a concentração final de 1×10^7 células por poço, sendo adicionado 2 mL de meio RPMI baixa glicose. Esperou-se 24 horas para a realização dos estímulos.

Passada as 24 horas da metodologia de tripsinização foram realizados os tratamentos dividindo as placas em três grupos: o primeiro com 2ng/mL de glicose, o segundo com 2ng/mL de LPS e o terceiro com 2ng/mL de glicose e LPS, sendo então, mantidas a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Após esse período foi realizada a coleta dos sobrenadantes das culturas e armazenamento a -80°C para posterior dosagem de citocinas e determinação da resposta imune ativada.

4.7 EXTRAÇÃO DE RNA DAS CULTURAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIzol®. O meio de cultura foi retirado do poço e, armazenado para posterior dosagem de citocinas, foram adicionados 750 µL de TRIzol® em cada poço e a pipetagem vigorosa foi realizada para promover a lise da células, a solução foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. O material foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 150 µL de clorofórmio, agitando-se vigorosamente durante 15 segundos. Após incubação à temperatura ambiente por 3 minutos, o material foi centrifugado a 12000 x *g* por 15 minutos. O sobrenadante incolor foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 375 µL de isopropanol gelado, a solução foi incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos para promover a precipitação do RNA. Em seguida o material foi centrifugado a 12000 x *g* durante 10 minutos a 4°C. Após descartar o sobrenadante, acrescentou-se 750 µL de etanol 75% ao *pellet* e o material foi centrifugado a 7500 x *g* por 5 minutos, após a lavagem o sobrenadante foi desprezado e o microtubo mantido aberto por 10 minutos para a secagem do *pellet*. O RNA foi diluído em 30 µL de água tratada com DEPC, sendo armazenado a -80°C. A etapa de quantificação e verificação de pureza da molécula foram similares a etapa descrita para a verificação do RNA total de sangue periférico, previamente descrita (Item 4.4).

4.8 SÍNTESE DE cDNA

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, EUA), seguindo as instruções estabelecidas pelo fabricante. A quantidade de RNA total padronizada para todas as amostras foi de 500 ng do RNA total isolado tanto das células dendríticas quanto das amostras de sangue periférico foi utilizado para a obtenção do cDNA final.

4.9 PCR EM TEMPO REAL

Os experimentos para a análise de expressão foram realizados no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*, utilizando o kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As sondas utilizadas para as análises foram as específicas para o gene alvo *CD209* (Hs01588349_m1), sendo os genes de referência adotados para as análises da expressão de sangue total o *GAPDH* (Hs02786624_g1) e *HPRT1* (02800695_m1). As reações foram incubadas no equipamento seguindo as condições da reação: 50°C durante 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto; para cada amostra foi realizada a triplicata técnica da expressão. As leituras de fluorescência foram realizadas pelo equipamento a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo *Sequence Detection Software* (SDS) v1.3 (Applied Biosystems).

A expressão quantitativa do gene de referência para o tipo celular específico avaliado neste trabalho foi realizada por meio de reações de RT-qPCR, utilizando o sistema de fluorescência SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City) para a quantificação dos produtos de amplificação. As condições de reação da RT-qPCR para o gene foi constituída de uma etapa a 50°C por 2 minutos, uma etapa a 95°C por 10 minutos, seguidas por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, para cada amostra foi realizada a triplicata técnica da expressão. As sequências do gene controle endógeno (GUSB), assim como, o tamanho do amplicon e temperatura de anelamento (T.A.) utilizada nas reações de qPCR estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos pares de iniciadores desenhados, tamanho dos amplicons e temperatura de anelamento utilizada nas reações de qPCR.

Gene	Acesso GenBank	Sequência dos iniciadores (5'- 3')		Amplicon (nt)	T.A. (°C)
		<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>		
GUSB	NG_016197	CACTGTGGCTGTCACCAAGA	TCCGCATCCTCATGCTTGTT	84	81,8°

Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para a correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção. Os resultados individuais expressos em valores de CT foram a seguir transferidos para planilhas e agrupados de acordo com o tipo de diabetes analisado e o controle correspondente, assim como as expressões das culturas que foram agrupadas de acordo com o estímulo para a realização da análise estatística.

4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-qPCR

Inicialmente realizou-se no próprio equipamento uma análise da curva de dissociação (curva de “*melting*”), a mesma teve como objetivo confirmar a amplificação específica através da temperatura de dissociação do produto de amplificação. Para a realização do cálculo da expressão gênica relativa aplicou-se o método do ΔCT comparativo; os valores de CT gerados foram transformados em $2^{-\Delta\Delta CT}$ para a realização das análises estatísticas, seguida de normalização pelos genes constitutivos.

As variáveis foram testadas quanto à sua distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Após a confirmação da normalidade da amostra, foi utilizado o teste *t Student*. O nível de significância adotado foi menor ou igual a 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE CD209 (DC-SIGN) EM INDIVÍDUOS COM DM1 E DM2

Quando analisados os dados referentes à expressão gênica a partir de amostras de sangue periférico (amostra *ex-vivo*), podemos identificar uma regulação negativa da expressão do gene CD209 em pacientes com DM quando comparados com indivíduos saudáveis. O gráfico 01 mostra a expressão relativa encontrada entre os indivíduos diabéticos (DM1 e DM2) em relação ao grupo controle. Para esta análise comparamos o grupo de pacientes DM como um todo, incluindo DM1 e DM2, *versus* indivíduos saudáveis. A análise comparativa entre os grupos mostrou diferença estatisticamente significativa nos níveis de RNAm do CD209 entre os indivíduos com DM1 e DM2 e os controles, sendo a expressão desse gene aumentada em 2,66 ($p=0,0003$) e 3,24 ($p=0,01$), respectivamente entre os grupos analisados.

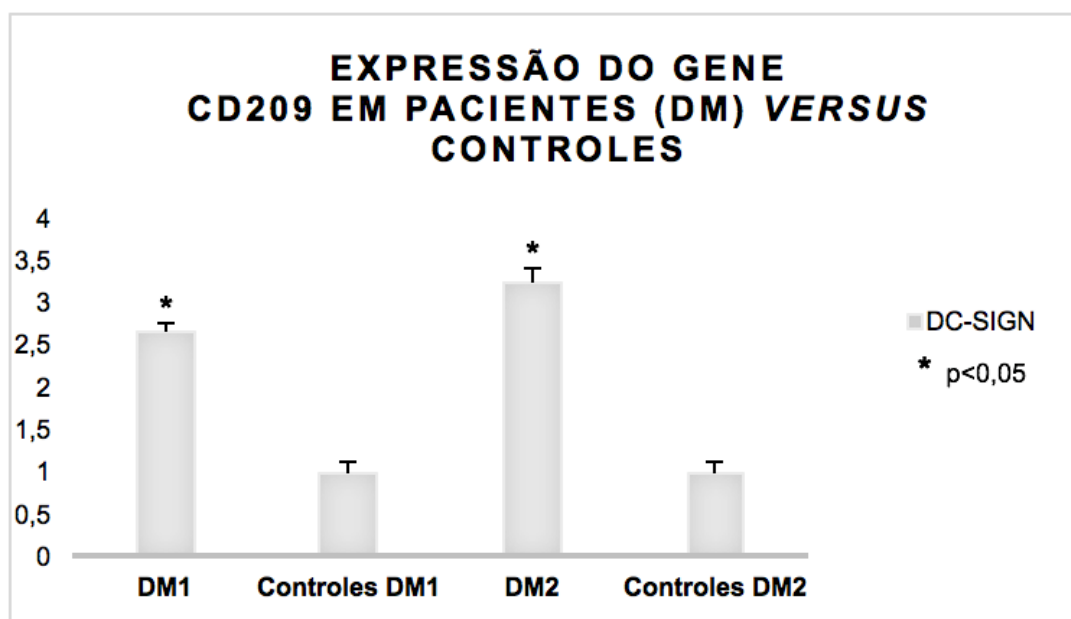


Gráfico 01: Comparação da expressão do RNAm CD209 entre os diabéticos e o grupo controle. Análises utilizando valores obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Valores do gráfico expressos em FC (*Fold Change*).

5.2 EXPRESSÃO DO RNAm DO CD209 (DC-SIGN) DE ACORODO COM O GENÓTIPO PARA OS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NA REGIÃO 5'UTR DESSE GENE NOS PACIENTES

No presente estudo foi realizada a análise genótipo-guiada, utilizando como referência para o perfil de expressão o genótipo ancestral, sendo o genótipo G/G o ancestral do rs735239 e o genótipo A/A o ancestral do rs4804803. Na expressão genótipo-guida dos indivíduos com DM1, os indivíduos com o genótipo A/A (rs735239) apresentam a expressão do gene alvo reduzida em 3,42 vezes quando comparado com o genótipo de referência ($p=0,0001$). No genótipo heterozigoto, a presença do alelo A também está associada à uma expressão diminuída de -1,23 ($p=0,005$) (Gráfico 02). A influência do polimorfismo rs4804803 sobre a expressão do gene *CD209* em pacientes com DM1 também demonstrou que o genótipo G/G aumenta a expressão desse gene em 3,06 vezes quando comparado ao genótipo ancestral ($p=0,01$), mantendo-se o aumento da expressão quando o genótipo A/G é analisado 1,56 ($p=0,03$) (Gráfico 02).

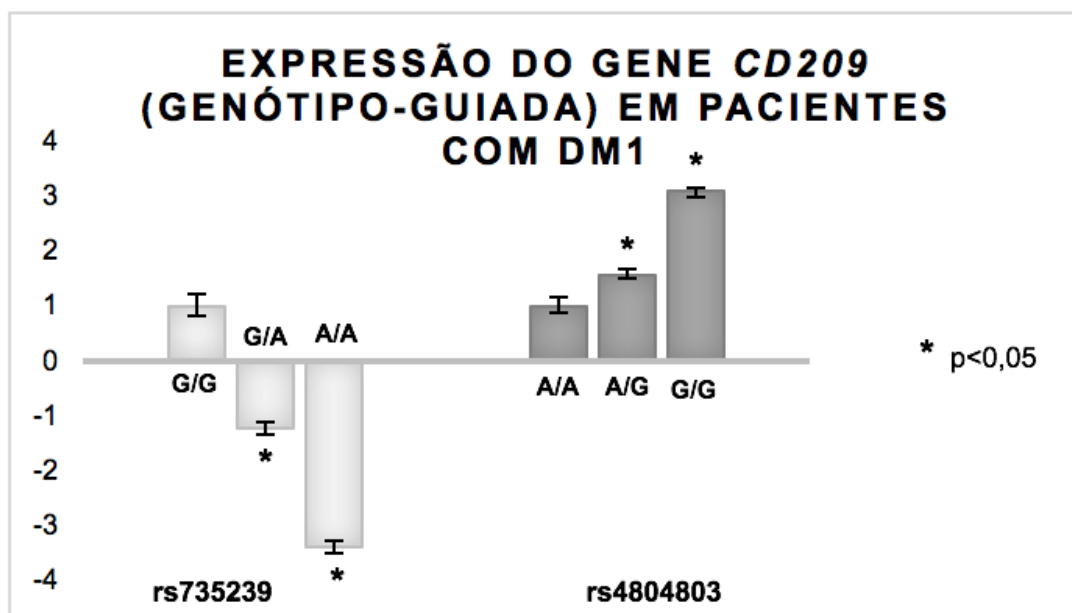


Gráfico 02 - Expressão relativa de RNAm do *CD209* de acordo com o genótipo em indivíduos com DM1. Análises utilizando valores obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Valores do gráfico expressos em FC (*Fold Change*).

O gráfico 03 apresenta a presença de polimorfismos e o papel destes na expressão de RNAm do CD209 em pacientes com DM2. É possível observar no Gráfico 03 que a expressão do gene CD209 encontra-se diminuída em 3,38 vezes no genótipo A/A ($p=7,5 \times 10^{-5}$) e 2,17 vezes no genótipo G/A ($p=0,01$) na presença do polimorfismo rs735239, ao passo que a presença do polimorfismo rs4804803, aumenta a expressão do gene alvo em 3,56 no genótipo G/G ($p=4,4 \times 10^{-5}$) e 1,55 vezes no genótipo A/G ($p=0,001$).

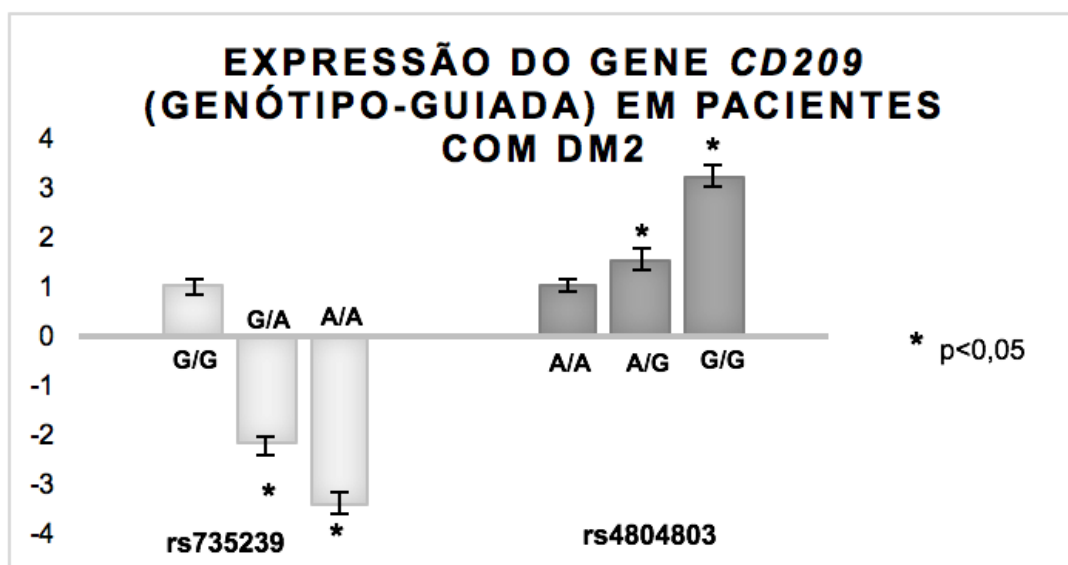


Gráfico 03 - Expressão relativa de RNAm do CD209 de acordo com o genótipo em indivíduos com DM2. Análises utilizando valores obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Valores do gráfico expressos em FC (Fold Change).

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO CD209 (DC-SIGN) EM CULTURAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS APÓS O ESTÍMULO COM GLICOSE E LPS

De forma a avaliar a hipótese proposta por Ilyas et al. (2011) de que a glicose seria capaz de alterar a expressão do DC-SIGN *in vivo*, realizamos os ensaios *in vitro* utilizando células dendríticas derivadas de monócitos provenientes de sangue total, no qual as células foram divididas em 3 grupos para a realização do estímulo: o primeiro foi estimulado com uma solução de glicose hiperconcentrada (2ng/mL) – mimetizando o estímulo do paciente diabético, o segundo com uma solução de LPS (2ng/mL) e o terceiro

estimulado com ambas as soluções simultaneamente. Durante o experimento foi possível observar um aumento de 11,97 vezes na expressão de RNAm do DC-SIGN (Gráfico 04) nas culturas estimuladas com a glicose (grupo 01) ($p=2,98 \times 10^{-10}$), sendo o aumento quase igualitário ao da expressão das culturas estimuladas com o do (grupo 02) LPS (12,45 vezes).

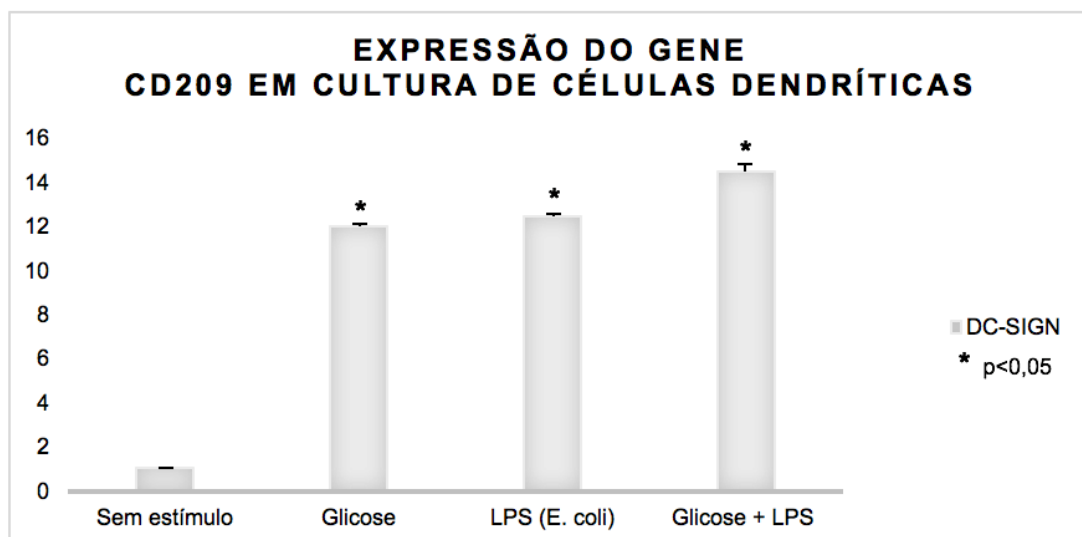


Gráfico 04 - Expressão relativa de RNAm do CD209 de acordo com o estímulo utilizado em células dendríticas. Análises utilizando valores obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Valores do gráfico expressos em FC (*Fold Change*).

5.4 EXPRESSÃO DO RNAm DO CD209 (DC-SIGN) DE ACORDO COM O GENÓTIPO PARA OS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NA REGIÃO 5'UTR DESSE GENE EM CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Com o intuito de verificar se as funções preditas, por Algarasu et. al (2013) para o rs735239 e Sakuntabhai et. al (2005) para o rs4804803, para os polimorfismos na região 5'UTR do gene CD209 são exatas realizamos os ensaios *in vitro* genótipo-guiado utilizando células dendríticas. Ao longo das análises, foi adotado como referência para o perfil de expressão do gene alvo (CD209) o genótipo ancestral para cada polimorfismo, sendo o genótipo G/G para o rs735239 e o genótipo A/A para o rs4808803. Os resultados obtidos são apresentados no Gráfico 05, sendo possível observar que a expressão do gene CD209 encontra-se diminuída em 2,71 vezes no genótipo A/A ($p=8,58 \times 10^{-5}$) e 1,35 vezes no genótipo G/A ($p=0,003$) na presença do polimorfismo rs735239,

enquanto que a presença do polimorfismo rs4804803, aumenta a expressão do gene alvo em 2,58 para o genótipo G/G ($p=0,001$) e 1,89 para o genótipo A/G ($p=0,02$).

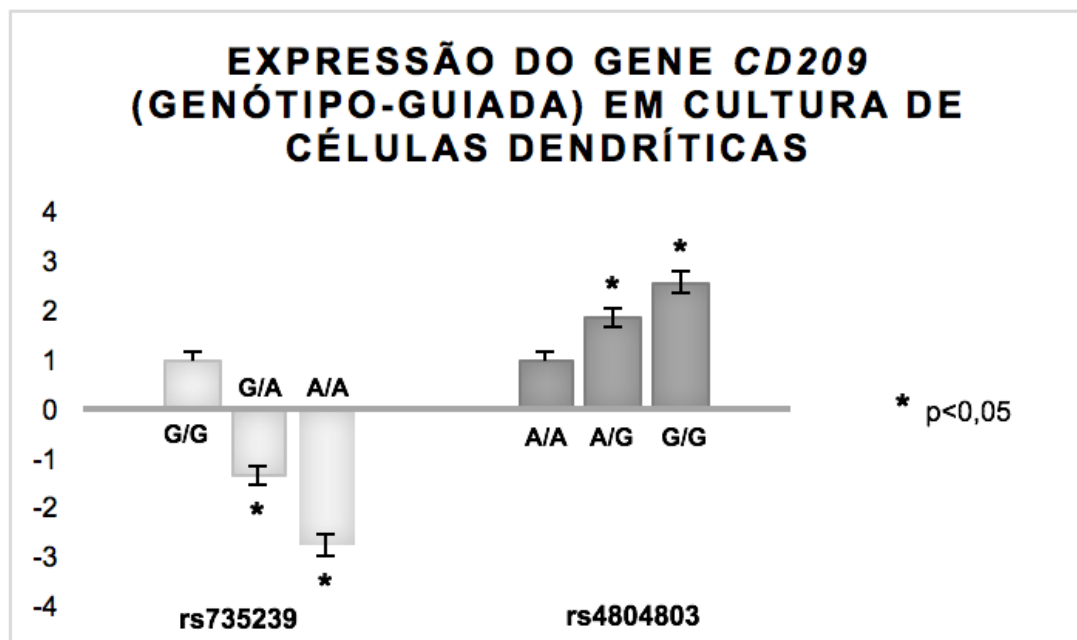


Gráfico 05 - Expressão relativa de RNAm do CD209 de acordo com o genótipo em células dendríticas estimuladas com glicose e LPS simultaneamente. Análises utilizando valores obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Valores do gráfico expressos em FC (*Fold Change*).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo verificou a existência de uma diferença de expressão do *CD209* entre os grupos de diabéticos e o grupo controle. O *CD209* apresentou expressão aumentada no grupo dos pacientes com DM quando comparamos com indivíduos saudáveis. Ademais, ocorre o aumento na expressão desse gene nas células dendríticas (DCs) após o estímulo com glicose.

As DCs são consideradas apresentadoras de antígenos “profissionais”, relacionando a resposta imune inata à resposta imune adaptativa (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994; THURNER et al., 1999), sendo essa interação de extrema importância no gatilho e manutenção do DM (AUDIGER et al., 2017; GANGULY et al., 2013; SOZZANI; DEL PRETE; BOSISIO, 2017). Considerando o papel desempenhado pelas DCs na ativação das células T, principal tipo celular envolvido com a inflamação no DM (AUDIGER et al., 2017; GANGULY et al., 2013), espera-se que o *CD209* possua uma alta expressão nesses pacientes. Corroborando esta hipótese, observou-se no presente estudo, um aumento na expressão do RNAm deste gene proveniente de sangue periférico de pacientes com DM1 e DM2 quando comparados ao grupo controle, com valor de FC 2,66 e 3,24, respectivamente. O aumento da expressão do *CD209* pode auxiliar no entendimento, sobre a susceptibilidade à infecções encontrada nos pacientes diabéticos, assim como, na elaboração de novas estratégias/intervenções terapêuticas para esses indivíduos.

Ainda no que diz respeito a expressão do gene alvo, eventos complexos de *splicing* alternativo no pré-RNAm do *CD209* produz uma matriz de transcritos responsáveis por codificar cinco grandes grupos de isoformas da proteína final DC-SIGN (MUMMIDI et al., 2001). Diversos estudos analisaram *in silico* o papel de polimorfismos na região promotora e as chances de risco para diferentes doenças (ALAGARASU et al., 2013; QU et al., 2015; YI et al., 2015; ZHU et al., 2010), com destaque para o estudo realizado por Silva et al. (2014) envolvendo pacientes diabéticos tipo 1, que analisou ambos os polimorfismos estudados nesta dissertação. Neste estudo observou-se que a expressão do *CD209* encontra-se diminuída em indivíduos diabéticos para o rs735239, com valor de FC para os genótipos de -1,23 (G/A) e -3,42 (A/A) em DM1 e -2,17

(G/A) e -3,38 (A/A) em DM2. Enquanto que, os resultados para o rs4804803 demonstram um aumento na expressão desse gene nesses pacientes, com valor de FC para os genótipos de 1,56 (A/G) e 3,06 (G/G) em DM1 e 1,56 (A/G) e 3,56 (G/G) em DM2. Algarasu *et al.* (2013) encontraram resultados semelhantes em seu estudo, onde o alelo polimórfico 'A' do rs735239 apresentou menor expressão do gene *CD209* em indivíduos infectados pelo vírus da dengue. Uma maior expressão do gene *CD209* para o alelo polimórfico 'G' foi observado por Sakuntabhai *et al.* (2005), visto que esse apresenta a função predita de maior capacidade de ligação com o fator Sp1 quando comparado ao alelo ancestral 'A'.

Em um terceiro momento, este estudo visou identificar se a hipótese proposta por Ilyas *et al.* (2011) de que a similaridade entre as características químicas da glicose e outras moléculas ricas em carboidratos, como por exemplo, os oligossacarídeos encontradas na parede celular de bactérias comensais, possuiria a capacidade de aumentar a expressão do *CD209*. Os resultados demonstram que a glicose possui a capacidade de estimular a expressão do gene alvo com valor de FC de +11,97 quando comparado ao grupo controle. É importante destacar que a expressão do gene *CD209* após o estímulo com LPS proveniente da bactéria *Eschericia coli* encontrou-se aumentada em 12,45 vezes quando comparada a cultura sem estímulo. Sendo assim, ao correlacionar os dados obtidos entre os estímulos de glicose e o de LPS é possível observar que a indução da expressão pela glicose quase se equiparou a expressão do lipopolissacarídeo da bactéria comensal.

Os polimorfismos de base única (SNPs) são as variações genômicas mais ocorrentes, a análise dos SNPs em regiões promotoras de vários genes humanos descrevem que estes ocorrem com maior frequência em regiões mais próximas ao sítio de início da transcrição (ZHAO *et al.*, 2011). A última parte deste estudo visou verificar se as funções preditas para os polimorfismos (rs735239 e rs4804803) são válidas, ou seja, se os alelos polimórficos podem estar influenciando a expressão do RNAm do gene *CD209*. Os resultados obtidos validam as funções preditas apontadas por Algarasu *et al.* (2013) e Sakuntabhai *et al.* (2005), uma vez que as análises genótipo-guiada em cultura específica demonstram que o genótipo polimórfico A/A do rs735239 influencia negativamente na expressão do gene *CD209* com *fold change* de -2,71,

enquanto que, o genótipo polimórfico G/G do rs4804803 influencia positivamente na expressão desse gene, com *fold change* de 2,58.

Sabendo-se que as análises de expressão gênica necessitam de normalização entre as amostras, sendo assim, a escolha do gene de referência torna-se crucial para as análises. O trabalho Wang *et al.* (2011) descreve o aumento da expressão do gene *CD209* em culturas genótipo-guiada no modelo heterozigoto A/G para o rs4804803, entretanto, o gene de referência utilizado no estudo foi o *B2M*. Ao passo que, em nosso estudo o gene de referência escolhido para normalização foi o *GUSB*, que apresentou uma taxa de variação na expressão inferior a 1 ciclo. Tal conduta permitiu verificar com maior acurácia o modo como esses polimorfismos estão influenciando na expressão gênica do *CD209*, uma vez que, em ambos os modelos (heterozigose e homozigose polimórfica) observou-se a diferença de expressão quando comparado ao grupo ancestral (A/A). A ausência de associação no modelo polimórfico (G/G), encontrada por Wang *et al.* (2011) pode ser relacionada a seleção equivocada do endógeno.

Classicamente, considera-se o paciente diabético mais propenso ao desenvolvimento de infecções, sejam elas bacterianas, fúngicas ou virais. Pessoas com o diagnóstico do DM são três vezes mais susceptíveis ao desenvolvimento de septicemia bacteriana e até mesmo a desfechos piores como o óbito (MULLER *et al.*, 2005; SHAH; HUX, 2003). Em 1974, Robertson *et al.* propuseram que, a fagocitose e apresentação defeituosa desses microrganismos nos indivíduos diabéticos, seriam os responsáveis pela a maior susceptibilidade à infecções.

As moléculas de glicose e manose apresentam similaridade estereoquímica nas posições dos carbonos C3 e C4, sendo a diferença encontrada apenas no carbono C2, onde na glicose é encontrado o grupamento hidroxila (-OH) e na manose o grupamento hidrogênio na mesma posição (-H) (ILYAS *et al.*, 2011). Desta maneira, com base nos resultados obtidos, nós sugerimos que nos pacientes com DM ocorre a sobrecarga dos receptores DC-SIGN pela molécula de glicose circulante, acarretando a falha no reconhecimento de PAMPs por esse receptor, com impacto no possível aumento da frequência de infecções oportunistas nesses indivíduos. Trata-se de uma consequência da redução na capacidade do sistema imune em

fagocitar e apresentar os patógenos corretamente, ou mesmo, pelo fato do sistema de reconhecimento estar em fadiga pelo excesso de estímulo.

Em suma, os dados obtidos sobre a expressão do *CD209* com a coorte pernambucana de pacientes com DM determina que existe a hiperexpressão desse gene nessa população. Além disso, foi possível identificar que este receptor reconhece avidamente a glicose como molécula sinalizadora em cultura de células dendríticas, bem como a validação das funções preditas para os polimorfismos analisados nessa pesquisa. Por conseguinte, este estudo fornece novas informações que podem contribuir para a elucidação dos mecanismos gênicos envolvidos na ativação do gene *CD209* e seu papel desempenhado no diabetes *mellitus*. Além de fornecer novos subsídios para pesquisas envolvendo novas modalidades de tratamento.

7 CONCLUSÕES

- ✓ O nível de expressão de RNAm do *CD209* de sangue periférico de pacientes com DM1 e DM2 encontra-se aumentado quando comparados a indivíduos não diabéticos.
- ✓ Os polimorfismos rs735239 influencia negativamente na expressão do gene *CD209*, enquanto que, o polimorfismo rs4804803 influencia positivamente na expressão desse gene.
- ✓ O aumento na concentração dos níveis de glicose reflete no acréscimo da expressão do gene *CD209*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADA, A. D. A. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. Supplement_1, p. S81–S90, 1 jan. 2014.
- ALAGARASU, K. et al. Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 17, p. 239–242, jul. 2013.
- ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, n. 7, p. 539–553, jul. 1998.
- ALI, O. Genetics of type 2 diabetes. **World J Diabetes**, v. 4, n. 4, 2013.
- ALMGREN, P. et al. Heritability and familiarity of type 2 diabetes and related quantitative traits in the Botnia Study. **Diabetologia**, v. 54, n. 11, p. 2811–2819, 9 nov. 2011.
- AUDIGER, C. et al. The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 6, p. 2223–2231, 15 mar. 2017.
- AUSTYN, J. M. Dendritic Cells in the Immune System—History, Lineages, Tissues, Tolerance, and Immunity. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 6, 1 dez. 2016.
- BAJAJ, K.; GROSS, S. J. The genetics of diabetic pregnancy. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 29, n. 1, p. 102–109, jan. 2015.
- BELLE, T. O. M. L. V. A N.; COPPIETERS, K. E. N. T.; HERRATH, M. G. V. O. N. Type 1 Diabetes : Etiology , Immunology , and Therapeutic Strategies. p. 79–118, 2011.
- BRORSSON, C. et al. The type 1 diabetes - HLA susceptibility interactome - Identification of HLA genotype-specific disease genes for type 1 diabetes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.
- CAI, M. et al. DC-SIGN expression on podocytes and its role in inflammatory immune response of lupus nephritis. **Clinical Experimental Immunology**, n. 1c, p. 2–31, 2015.
- CAMPBELL-THOMPSON, M. L. et al. The diagnosis of insulinitis in human type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 56, n. 11, p. 2541–2543, 5 nov. 2013.
- CANIVELL, S.; GOMIS, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4–5, p. 403–407, 2014.
- CÁRDENAS-ROLDÁN, J. et al. How do autoimmune diseases cluster in families? A systematic review and meta-analysis. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 73, 18 dez. 2013.
- CHEUNG, N. W.; BYTH, K. Population Health Significance of Gestational Diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 7, p. 2005–2009, 1 jul. 2003.
- DA SILVA, R. C. et al. DC-SIGN polymorphisms are associated to type 1 diabetes mellitus. **Immunobiology**, v. 219, n. 11, p. 859–865, 2014.
- DAMBUZA, I. M.; BROWN, G. D. C-type lectins in immunity: recent developments. **Current Opinion in Immunology**, v. 32, p. 21–27, fev. 2015.
- DELLA MANNA, T. et al. Diabetes mellitus in childhood: an emerging condition in the 21st century. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 6, p. 594–601, set. 2016.

- DONATH, M. Y. et al. Islet inflammation impairs the pancreatic beta-cell in type 2 diabetes. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 24, n. 6, p. 325–31, dez. 2009.
- DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 98–107, 14 fev. 2011.
- DOS SANTOS, Á. et al. Oligomerization domains in the glycan-binding receptors DC-SIGN and DC-SIGNR: Sequence variation and stability differences. **Protein Science**, v. 26, n. 2, p. 306–316, 1 fev. 2017.
- DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 34, p. 26–34, out. 2015.
- ENERGING, A. et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 5, p. 2118–2126, 2002.
- ERLICH, H. et al. HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk. **Diabetes**, v. 57, n. 4, 2008.
- FERREIRA, S. R. et al. Population-Based Incidence of IDDM in the State of São Paulo, Brazil. **Diabetes Care**, v. 16, n. 5, 1993.
- FU, Z.; GILBERT, E.; LIU, D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. **Current Diabetes Reviews**, v. 9, n. 1, p. 25–53, 1 jan. 2013.
- FUCHSBERGER, C. et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. **Nature**, v. 536, n. 7614, p. 41–7, 2016.
- GANGULY, D. et al. The role of dendritic cells in autoimmunity. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 8, p. 566–577, 2013.
- GEIJTENBEEK, T. B. et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 575–585, 2000.
- GEIJTENBEEK, T. B. H.; GRINGHUIS, S. I. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 7, p. 433–449, 1 jul. 2016.
- GRANT, R. W.; DIXIT, V. D. Mechanisms of disease: Inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAR, p. 1–10, 2013.
- GRARUP, N. et al. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: From genome-wide association studies to rare variants and beyond. **Diabetologia**, v. 57, n. 8, p. 1528–1541, 2014.
- GUARIGUATA, L. et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 103, n. 2, p. 137–149, 2014.
- GUERDER, S. et al. Dendritic cells in tolerance and autoimmune diabetes. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 670–675, dez. 2013.
- GUILLIAMS, M. et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 8, p. 571–8, 2014.
- HALBAN, P. A. et al. β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 6, p. 1983–1992, 1 jun. 2014.
- HEMMINKI, K. et al. Familial Risks for Type 2 Diabetes in Sweden. **Diabetes Care**, v. 33, n. 2, 2010.
- HESPEL, C.; MOSER, M. Role of inflammatory dendritic cells in innate and

- adaptive immunity. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 10, p. 2535–2543, out. 2012.
- HOVING, J. C.; WILSON, G. J.; BROWN, G. D. Signalling C-Type lectin receptors, microbial recognition and immunity. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 185–194, 1 fev. 2014.
- HU, F. B. et al. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes care**, v. 34, n. 6, p. 1249–57, jun. 2011.
- HUBO, M. et al. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 82, 2013.
- IDF, I. D. F. IDF Diabetes Atlas. v. 7 edição, p. 144, 2015.
- ILYAS, R. et al. Immunobiology High glucose disrupts oligosaccharide recognition function via competitive inhibition: A potential mechanism for immune dysregulation in diabetes mellitus. v. 216, p. 126–131, 2011.
- JOSHI, M. D. et al. DC-SIGN mediated antigen-targeting using glycan-modified liposomes: Formulation considerations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 2, p. 426–432, 2011.
- KATSAROU, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17016, 30 mar. 2017.
- KUHN, C. et al. Regulatory mechanisms of immune tolerance in type 1 diabetes and their failures. **Journal of Autoimmunity**, v. 71, p. 69–77, 2016.
- KWON, H.; PESSIN, J. E. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, p. 71, 2013.
- LAMPASONA, V.; LIBERATI, D. Islet Autoantibodies. **Current Diabetes Reports**, v. 16, n. 6, p. 53, 25 jun. 2016.
- LAWLOR, N. et al. Genomics of Islet (Dys)function and Type 2 Diabetes. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 4, p. 244–255, abr. 2017.
- LEE, M.-S. Role of innate immunity in diabetes and metabolism: recent progress in the study of inflammasomes. **Immune network**, v. 11, n. 2, p. 95–9, 2011.
- LEY, S. H. et al. Prevention and management of type 2 diabetes: dietary components and nutritional strategies. **Lancet (London, England)**, v. 383, n. 9933, p. 1999–2007, 7 jun. 2014.
- LISBÔA, H. R. K. et al. Incidence of type 1 diabetes mellitus in Passo Fundo, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 12, p. 1553–1556, dez. 1998.
- LOWE, W. L. et al. Genetics of Gestational Diabetes Mellitus and Maternal Metabolism. **Current Diabetes Reports**, v. 16, n. 2, p. 15, 23 fev. 2016.
- LYSSENKO, V. et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 8, p. 2155–2163, 1 ago. 2007.
- MAUVAIS, F.-X.; DIANA, J.; VAN ENDERT, P. Beta cell antigens in type 1 diabetes: triggers in pathogenesis and therapeutic targets. **F1000Research**, v. 5, p. 728, 22 abr. 2016.
- MBONGUE, J. C. et al. The Role of Dendritic Cell Maturation in the Induction of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 327, 27 mar. 2017.
- MILDNER, A.; JUNG, S. Development and function of dendritic cell subsets. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 642–56, 15 maio 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA - Diabetes Mellitus. **Cadernos de Atenção Básica, A. Normas e Manuais Técnicos**, v.

16, p. 110, 2013.

MORRIS, A. P. et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. **Nature genetics**, v. 44, n. 9, p. 981–90, set. 2012.

MULLER, L. M. A. J. et al. Increased Risk of Common Infections in Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 3, p. 281–288, 1 ago. 2005.

MUMMIDI, S. et al. Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1 (DC-SIGN1) and DC-SIGN2 isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 35, p. 33196–212, 31 ago. 2001.

NOBLE, J. A. Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v. 64, p. 101–112, 2015.

POCIOT, F.; LERNMARK, Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 387, n. 10035, p. 2331–2339, 4 jun. 2016.

PRASAD, R.; GROOP, L. Genetics of Type 2 Diabetes—Pitfalls and Possibilities. **Genes**, v. 6, n. 4, p. 87–123, 12 mar. 2015.

PULENDRAN, B. The Varieties of Immunological Experience: Of Pathogens, Stress, and Dendritic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 563–606, 21 mar. 2015.

QU, X. et al. Association of Dectin-1 and DC-SIGN gene single nucleotide polymorphisms with fungal keratitis in the northern Han Chinese population. **Molecular vision**, v. 21, p. 391–402, 2015.

QUINTANA, F. J. Dendritic cells in autoimmunity, infections, and cancer. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 2, p. 97–98, 16 fev. 2017.

SACKS, D. A. et al. Frequency of Gestational Diabetes Mellitus at Collaborating Centers Based on IADPSG Consensus Panel-Recommended Criteria: The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. **Diabetes Care**, v. 35, n. 3, p. 526–528, 1 mar. 2012.

SAKUNTABHAI, A. et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nature Genetics**, v. 37, n. 5, p. 507–513, 17 maio 2005.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 4, 1994.

SANTIN, I.; EIZIRIK, D. L. Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and β -cell apoptosis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. s3, p. 71–81, set. 2013.

SATO, A.; IWAMOTO, Y. Diagnostic criteria of diabetes. **Diabetology International**, v. 4, n. 2, p. 77–80, 21 jun. 2013.

SAXENA, R. et al. Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. **Science**, v. 316, n. 5829, 2007.

SCHLITZER, A.; MCGOVERN, N.; GINHOUX, F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 41, p. 9–22, maio 2015.

SHAH, B. R.; HUX, J. E. Quantifying the Risk of Infectious Diseases for People With Diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 2, 2003.

SINGH, V. P. et al. Advanced Glycation End Products and Diabetic

- Complications. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 18, n. 1, p. 1, 1 fev. 2014.
- SOZZANI, S.; DEL PRETE, A.; BOSISIO, D. Dendritic cell recruitment and activation in autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, 31 jul. 2017.
- STEINMAN, R. M. Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 1–22, 23 abr. 2012.
- STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. **Journal of Experimental Medicine**, v. 137, n. 5, 1973.
- TANGVARASITTICHA, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 3, p. 456–80, 15 abr. 2015.
- THURNER, B. et al. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. **Journal of Immunological Methods**, v. 223, n. 1, p. 1–15, fev. 1999.
- VAN KOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T. B. H. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 9, p. 697–709, 2003.
- VAN LIEMPT, E. et al. Specificity of DC-SIGN for mannose- and fucose-containing glycans. **FEBS Letters**, v. 580, n. 26, p. 6123–6131, 2006.
- WANG, Z. et al. Beyond Genetics: What Causes Type 1 Diabetes. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 52, n. 2, p. 273–286, 22 abr. 2017.
- WHITING, D. R. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 94, n. 3, p. 311–321, 2011.
- WORBS, T.; HAMMERSCHMIDT, S. I.; FÖRSTER, R. Dendritic cell migration in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 30–48, 28 nov. 2016.
- YAN, J.; YANG, H. Gestational diabetes mellitus, programing and epigenetics. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 27, n. 12, p. 1266–1269, 30 ago. 2014.
- YANG, Y.; SANTAMARIA, P. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. **Clinical Science**, v. 110, n. 6, 2006.
- YI, L. et al. The association between CD209 gene polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 10, p. 12437–45, 2015.
- ZHANG, F.; REN, S.; ZUO, Y. DC-SIGN, DC-SIGNR and LSECtin: C-Type Lectins for Infection. **International Reviews of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 54–66, 24 jan. 2014.
- ZHAO, Y. et al. Prediction of functional regulatory SNPs in monogenic and complex disease. **Human Mutation**, v. 32, n. 10, p. 1183–1190, 1 out. 2011.
- ZHOU, H.; WU, L. The development and function of dendritic cell populations and their regulation by miRNAs. **Protein & Cell**, 31 mar. 2017.
- ZHU, D. et al. Influence of polymorphism in dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related (DC-SIGNR) gene on HIV-1 trans-infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 598–602, 19 mar. 2010.
- ZIEGLER, A.-G.; NEPOM, G. T. Prediction and Pathogenesis in Type 1 Diabetes. **Immunity**, v. 32, n. 4, p. 468–478, 2010.

ANEXOS A - PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO Journal of Genetics (Qualis B4)

© Indian Academy of Sciences

RESEARCH NOTE



Polymorphism in ficolin-1 (*FCNI*) gene is associated with an earlier onset of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents from northeast Brazil

ZILMA PEREIRA DOS ANJOSA¹, MANUELLA MARIA SILVA SANTOS², NATASSIA JAVORSKI RODRIGUES³,
GLAUCIA ALYNE NUNES DE LACERDA³, JAQUELINE ARAUJO⁴, JAQUELINE DE AZEVEDO SILVA³,
NATHÁLIA DE ALENCAR CUNHA TAVARES³, RAFAEL LIMA GUIMARÃES^{2,3},
SERGIO CROVELLA^{2,3,*} and LUCAS ANDRÉ CAVALCANTI BRANDÃO^{1,3}

¹Department of Pathology, ²Department of Genetics, ³Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), and ⁴Pediatric Endocrinology Unity of Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-901 Brazil

[Anjosa Z. P. D., Santos M. M. S., Rodrigues N. J., Lacerda G. A. N. D., Araujo J., Silva J. D. A., Tavares N. D. A. C., Guimarães R. L., Crovella S. and Brandão L. A. C. 2016 Polymorphism in ficolin-1 (*FCNI*) gene is associated with an earlier onset of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents from northeast Brazil. *J. Genet.* **95**, xx–xx]

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO Inflammopharmacology (Qualis B2)

Inflammopharmacol
DOI 10.1007/s10787-017-0322-7

Inflammopharmacology

ORIGINAL ARTICLE



Polymorphisms in key bone modulator cytokines genes influence bisphosphonates therapy in postmenopausal women

C. A. D. Lima^{1,2} · N. R. Javorski^{1,2} · A. P. O. Souza² · A. D. Barbosa^{2,3} ·
A. P. M. C. Valença⁴ · S. Crovella^{1,2} · P. R. E. Souza^{2,5} · J. De Azevedo Silva^{1,2} ·
P. Sandrin-Garcia^{1,2}

Received: 16 December 2016 / Accepted: 28 January 2017
© Springer International Publishing 2017

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO Gene Amsterdam (Qualis B2)

Gene

Volume 642, 5 February 2018, Pages 58-63



Research paper

Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms are associated to spontaneous preterm birth and maternal aspectsN. Javorski^{a, b}, C.A.D. Lima^{a, b}, L.V.C. Silva^c, S. Crovella^{a, b}, J. de Azêvedo Silva^{a, b}   **Show more**<https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.087>