UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ADRIANE FEIJÓ EVANGELISTA

Análise integrativa de perfis transcricionais de pacientes com diabetes mellitus tipo 1, tipo 2 e gestacional, comparando-os com manifestações demográficas, clínicas, laboratoriais, fisiopatológicas e terapêuticas

ADRIANE FEIJÓ EVANGELISTA

Análise integrativa de perfis transcricionais de pacientes com diabetes mellitus tipo 1, tipo 2 e gestacional, comparando-os com manifestações demográficas, clínicas, laboratoriais, fisiopatológicas e terapêuticas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi

Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos

Ribeirão Preto – 2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Evangelista, Adriane Feijó

Análise integrativa de perfis transcricionais de pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1, tipo 2 e gestacional, comparando-os com manifestações demográficas, clínicas, laboratoriais, fisiopatológicas e terapêuticas.

Ribeirão Preto, 2012

192p.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de Concentração: Genética.

Orientador: Donadi, Eduardo Antonio

Co-orientador: Passos, Geraldo A.

1. Expressão gênica – <i>microarrays</i>	2. Análise bioinformática por <i>module maps</i>	
3. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1	4. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2	5. <i>Diabetes mellitus</i> gestacional

FOLHA DE APROVAÇÃO

ADRIANE FEIJÓ EVANGELISTA

Análise integrativa de perfis transcricionais de pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1, tipo 2 e gestacional, comparando-os com manifestações demográficas, clínicas, laboratoriais, fisiopatológicas e terapêuticas.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico especialmente este trabalho

Aos meus pais Laercio e Rita

Ao meu irmão Renato

Ao meu namorado Eduardo

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Antonio Donadi pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, pelo apoio científico e pessoal, pelo exemplo a ser seguido.

Ao meu co-orientador no Brasil Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Jr. e ao meu supervisor estrangeiro na França Prof. Dr. Denis Puthier pela imensa contribuição neste trabalho, e pela formação científica.

Aos pesquisadores participante do projeto temático FAPESP, ao qual este trabalho está inserido. A Prof. Dra. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo, pela contribuição científica e correção do manuscrito para publicação. Ao prof. Dr. Milton Cesar Foss e à prof. Dra. Maria Cristina Foss-Freitas pela orientação clínica e seleção dos pacientes. À Dra. Diane Meyre Rassi pela participação na etapa da seleção e coleta das amostras.

À equipe francesa. À Prof. Dra. Catherine Nguyen, diretora da unidade INSERM-U928, pelo apoio e autorização da utilização das dependências e treinamento. Ao Prof. Dr. Pascal Rihet pelas discussões e sugestões de análises, de grande valia neste trabalho. Aos Prof. Dr. Carl Hermann e Prof. Dr. Sammuel Granjeau pelas sugestões e ensinamentos em programação em linguagens R e PERL. Aos técnicos Hélène Holota, Bèatrice Loriod e, em especial, à Gènèvieve Victorero por todos os ensinamentos.

A divisão de endocrinologia do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em cujas dependências foram obtidas as amostras. Ao laboratório de HLA do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial à técnica Neife Deghaide. A todos os funcionários que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho. Aos pacientes, sem os quais esse trabalho não poderia ser realizado.

Ao Laboratório de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). Agradeço aos colegas Danilo Xavier, Cristhianna Collares, Renata Almeida, Paula Takahashi, Fernanda Manoel-Caetano, Thais Arns, Natália Joanne, Amanda Assis, Flávia Porto, Juliana Massaro, Ernna Domingues, Claudia Macedo, Thais Fornari, Paula Donate, Janaina Dernowsek e Nicole Pezzi. Aos colegas que contribuíram com a minha formação desde o mestrado: Cristina Junta e Márcia Marques.

Ao programa de Pós-graduação em Genética, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Agradeço aos professores pela qualidade da formação e aos colegas de pós-graduação. Agradeço à secretaria do departamento, em especial às secretárias Susie, Silvia e Maria Aparecida pela eficiência e ajuda todos esses anos.

Ao CNPq FAPESP, e FAEPA pelo apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela prontidão, contribuições, críticas e sugestões.

Aos meus queridos amigos Ana Durvalina Bomtorin, Breno Mello, Ana Rita Batistela e Andressa Morales pelo companheirismo. Aos amigos da França, Miriam Yammine, Elise Yammine, Alberto Marcus, Joanna Bou Saab, Daou Pascale, Sabrina Sanfilippo, Yuska Aguiar e Luciana Lopes pelas discussões científicas e pelos grandes momentos vividos.

Aos meus pais Laércio e Rita pelo exemplo de vida e superação. A toda minha família que sempre me apoiou. Ao meu namorado Carlos Eduardo Silva Lazzarini, e à sua família, pelo companheirismo, paciência e incentivo de extrema importância no período de realização deste trabalho, e em todos os momentos.

RESUMO

Evangelista, A. F. **Análise integrativa de perfis transcricionais de pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1, tipo 2 e gestacional, comparando-os com manifestações demográficas, clínicas, laboratoriais, fisiopatológicas e terapêuticas.** 2012. 192p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2012.

O *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) tem etiologia autoimune, enquanto o *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) e o *diabetes mellitus* gestacional (DMG) são considerados como distúrbios metabólicos. Neste trabalho, foi realizada análise do transcriptoma das células mononucleares do sangue periférico (do inglês, *peripheral mononuclear blood cells* - PBMCs), obtidas de pacientes com DM1, DM2 e DMG, realizando análises por *module maps* a fim de comparar características patogênicas e aspectos gerais do tratamento com anotações disponíveis de genes modulados, tais como: a) análises disponíveis a partir de estudos de associação em larga escala (do inglês *genome-wide association studies* – GWAS); b) genes associados ao diabetes em estudos clássicos de ligação disponíveis em bancos de dados públicos; c) perfis de expressão de células imunológicas fornecidos pelo grupo *ImmGen* (*Immunological Project*). Foram feitos *microarrays* do transcriptoma total da plataforma Agilent (*Whole genome one-color Agilent 4x44k*) para 56 pacientes (19 DM1, 20 DM2 e 17 DMG). Para a compreensão dos resultados foram aplicados filtros não-informativos e as listas de genes diferencialmente expressos foram obtidas por análise de partição e análise estatística não-paramétrica (*rank products*), respectivamente. Posteriormente, análises de enriquecimento funcional foram feitas pelo DAVID e os *module maps* construídos usando a ferramenta Genomica. As análises funcionais contribuíram para discriminar os pacientes a partir de genes envolvidos na inflamação, em especial DM1 e DMG. Os *module maps* de genes diferencialmente expressos revelaram: a) genes modulados exibiram perfis de transcrição típicos de macrófagos e células dendríticas, b) genes modulados foram associados com genes previamente descritos como genes de complicação ao diabetes a partir de estudos de ligação e de meta-análises; c) a duração da doença, obesidade, número de gestações, níveis de glicose sérica e uso de medicações, tais como metformina, influenciaram a expressão gênica em pelo menos um tipo de diabetes. Esse é o primeiro estudo de *module maps* mostrando a influência de padrões epidemiológicos, clínicos, laboratoriais, imunopatogênicos e de tratamento na modulação dos perfis transcricionais em pacientes com os três tipos clássicos de diabetes: DM1, DM2 e DMG.

Palavras-chave: Expressão gênica, *microarrays*, bioinformática, *module maps*, *diabetes mellitus* tipo 1, *diabetes mellitus* tipo 2, *diabetes mellitus* gestacional.

ABSTRACT

Evangelista, A. F. **Integrative analysis of transcriptional profiles in type 1, type 2 and gestational *diabetes mellitus*, compared with demographic, clinical, laboratory, physiopathology and therapeutic manifestations.** 2012. 192p. Thesis (PhD Degree) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, 2012.

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease while type 2 (T2D) and gestational diabetes (GDM) are considered as metabolic disturbances. We performed a transcriptome analysis of peripheral mononuclear blood cells obtained from T1D, T2D and GDM patients, and we took advantage of the module map approach to compare pathogenic and treatment features of our patient series with available annotation of modulated genes from i) genome-wide association studies; ii) genes provided by diabetes meta-analysis in public databases, iii) immune cell gene expression profiles provided by the ImmGen project. Whole genome one-color Agilent 4x44k microarray was performed for 56 (19 T1D, 20 T2D, 17 GDM) patients. Non-informative filtered and differentially expressed genes were obtained by partitioning and rank product analysis, respectively. Functional analyses were carried out using the DAVID software and module maps were constructed using the Genomica tool. Functional analyses contributed to discriminate patients on the basis of genes involved in inflammation, primarily for T1D and GDM. Module maps of differentially expressed genes revealed that: i) modulated genes exhibited transcription profiles typical of macrophage and dendritic cells, ii) modulated genes were associated with previously reported diabetes complication genes disclosed by association and meta-analysis studies, iii) disease duration, obesity, number of gestations, glucose serum levels and the use of medications, such as metformin, influenced gene expression profiles in at least one type of diabetes. This is the first module map study to show the influence of epidemiological, clinical, laboratory, immunopathogenic and treatment features on the modulation of the transcription profiles of T1D, T2D and GDM patients.

Palavras-chave: Gene expression – microarrays, bioinformatic analysis by module maps, type 1 diabetes mellitus, type 2 diabetes mellitus, gestational diabetes mellitus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Gráfico representativo dos eventos associados com a perda da massa de células beta pancreáticas ao longo do tempo devido à mecanismos autoimunes no DM 1. Adaptado de (EISENBARTH, GEORGE S; JEFFREY, 2008)	25
Figura 2. Valor preditivo e datas da identificação dos locos de susceptibilidade ao DM1. Adaptado de (POCIOT et al., 2010).	28
Figura 3. Valor preditivo e datas da identificação dos alelos de susceptibilidade ao DM2. Adaptado PROKOPENKO (2008).	34
Figura 4. Distribuição de alelos de risco previamente associados ao DM2 em indivíduos com intolerância à glicose e no DMG. O efeito do risco é aumentado pela combinação de 11 genes principais. Adaptado de LAUENBORG (2009).	41
Figura 5. <i>Heatmap</i> representativo das variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e terapêuticas utilizadas nas análises bioinformáticas deste trabalho.	53
Figura 6. Esquema representativo das reações de transcrição reversa, amplificação, purificação e hibridação de <i>microarrays</i> da plataforma Agilent. Adaptado de (“G4140-90040_GeneExpression_One-color_v6.5.pdf (objeto application/pdf)”, [S.d.])	58
Figura 7. <i>Pipeline</i> representativo da análise integrativa dos perfis transcricionais com variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e terapêuticas, usando a estratégia de <i>module maps</i> . Em A) Genes filtrados por <i>fold change</i> são selecionados quanto à sua representatividade nos <i>gene sets</i> ; B) Genes identificados nas categorias fornecidas do <i>gene set</i> são separados em módulos de expressão; C) Os módulos são re-agrupados; D) Os módulos significativos são finalmente comparados com os <i>array sets</i> , gerando os <i>heatmaps</i> finais. Adaptado de (SEGAL et al., 2004)	63
Figura 8. Parâmetros utilizados na análise de <i>module maps</i>	64
Figura 9. Distribuição das frequências dos dados contra os valores de expressão em escala logarítmica em uma lâmina de microarray Agilent. Encontram-se destacados os valores de <i>background</i> e o valor de corte utilizado para filtragem.	72
Figura 10. Gráficos <i>boxplot</i> de todos os dados de <i>microarrays</i> utilizados neste trabalho, após a normalização pela metodologia <i>quantile</i>	73
Figura 11. Gráficos <i>MA plots</i> de todos os <i>microarrays</i> utilizados neste trabalho. Encontram-se representadas a razão da intensidade de sinal de cada <i>microarray</i> na abcissa e a intensidade de sinal gerada pela mediana dos sinais de todos os <i>microarrays</i> na ordenada.	74
Figura 12. Agrupamento hierárquico da correlação de Pearson dos 19 agrupamentos de genes coregulados identificados pela análise de partição DBF-MCL. Encontra-se em destaque o agrupamento 12	76

Figura 13. Gráfico da análise do componente principal (<i>Principal component analysis-PCA</i>) mostrando a disposição espacial dos pacientes com DM-1 (amarelo), DM-2 (verde) e DMG (vermelho). Nesta análise foram considerados todos os genes identificados pelo filtro não-informativo DBF-MCL.	77
Figura 14. Gráfico da análise do componente principal (<i>Principal component analysis-PCA</i>) mostrando a disposição espacial dos pacientes com DM-1 (amarelo), DM-2 (verde) e DMG (vermelho). Nesta análise foram considerados genes identificados pelo filtro não informativo DBF-MCL, com exceção dos genes pertencentes ao agrupamento 12.	78
Figura 15. <i>Heatmap</i> ilustrativo das categorias significativas por agrupamentos gênicos identificados por DBF-MCL. Foram dispostas categorias significativas do <i>Gene Ontology</i> e das vias <i>Kegg</i> e <i>Biocarta</i> , identificados pela análise de enriquecimento funcional DAVID.	79
Figura 16. Diagrama de Venn contendo os números de genes específicos e compartilhados entre análises estatísticas por <i>rank products</i> . Em A) DM1 versus DMG; B) DM2 versus DMG; C) DM1 versus DM2. Nas intersecções são ressaltados os números de genes específicos em cada tipo de diabetes.	81
Figura 17. <i>Heatmap</i> ilustrativo das categorias significativas por análise de <i>rank products</i> . Foram dispostas categorias significativas do <i>Gene Ontology</i> e das vias <i>Kegg</i> e <i>Biocarta</i> , identificados pela análise de enriquecimento funcional DAVID.	82
Figura 18. <i>Heatmap</i> contendo assinatura gênica típica de macrófagos. Os genes diferencialmente expressos representados foram identificados a partir da análise <i>rank products</i> DM1 versus DMG. Em vermelho estão destacados genes previamente associados ao diabetes.	90
Figura 19. <i>Heatmap</i> contendo assinatura gênica típica de células dendríticas. Os genes diferencialmente expressos foram identificados a partir da análise <i>rank products</i> DM1 versus DM2. Em vermelho estão destacados genes previamente associados ao diabetes.	91
Figura 20. <i>Heatmap</i> contendo assinatura gênica típica de genes associados à obesidade. Os genes diferencialmente expressos foram identificados a partir da análise <i>rank products</i> DM2 versus DMG. Em vermelho estão destacados genes previamente associados ao diabetes.	92
Figura 21. <i>Heatmaps</i> representativos dos <i>module maps</i> contendo genes previamente identificados a partir das análises: A) DBF-MCL; B) <i>Rank products</i> DM1 versus DMG; C) <i>Rank products</i> DM2 versus DMG; C) <i>Rank products</i> DM1 versus DM2.	93
Figura 22. Esquema ilustrativo da relação entre o metabolismo e a inflamação no diabetes pela indução da via de sinalização <i>NOD-like</i> . Adaptado de (TANNAHILL; O'NEILL, 2011).	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais genes, variações genéticas e função dos genes associados com a susceptibilidade ao DM2. Modificado de (BILLINGS; FLOREZ, JOSE C, 2010; BUNT, VAN DE; GLOYN, 2010)..	35
Tabela 2. Média e desvio padrão de características quantitativas (não-binárias) de todos os pacientes, utilizadas na construção da variável <i>array set</i> para análise de <i>module maps</i> .	53
Tabela 3. Genotipagem <i>HLA-DQA1/HLA-DQB1</i> de pacientes com DM1.	70
Tabela 4. Funções de genes relacionados ao sistema imune, identificados pela análise estatística <i>rank products</i> .	83
Tabela 5. Compilação das análises realizadas nos dados de <i>microarrays</i> dos 12 tipos celulares, obtidos pela banco de dados <i>ImmGen</i> . As assinaturas geradas foram usadas na construção dos <i>gene sets</i> e dos <i>module maps</i> .	85
Tabela 6 Compilação do número de genes identificados em dois bancos de dados (<i>GWAS integrator</i> e <i>Phenopedia</i>). As assinaturas geradas foram usadas como <i>gene sets</i> na construção dos <i>module maps</i> .	88

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 (DM1).....	24
1.1.1. Patogênese do <i>diabetes mellitus</i> tipo 1	25
1.1.2. Genética do <i>diabetes mellitus</i> tipo 1	27
1.2. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2 (DM-2)	31
1.2.1. Patogênese do <i>diabetes mellitus</i> tipo 2	32
1.2.2. Genética do <i>diabetes mellitus</i> tipo 2.....	33
1.3. <i>Diabetes mellitus</i> gestacional (DMG)	37
1.3.1. Patogênese do <i>diabetes mellitus</i> gestacional	39
1.3.2. Genética do <i>diabetes mellitus</i> gestacional	40
1.4. Análise Bioinformática aplicada ao <i>diabetes</i>	42
2. HIPÓTESE	45
3. OBJETIVOS	47
3.1. Geral	47
3.2. Específicos	47
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DA ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	50
5. MATERIAL E MÉTODOS	52
5.1. Casuística e população de estudo	52
5.2. Coleta de sangue e isolamento de células mononucleares do sangue periférico	54
5.3. Extração de RNA e DNA de células mononucleares do sangue periférico.....	54
de pacientes com <i>diabetes mellitus</i> tipo 1, tipo 2 e gestacional	54
5.4. Genotipagem HLA de classe II dos pacientes com <i>diabetes mellitus</i> tipo 1	56
5.5. Reação de hibridação com <i>oligo-microarrays</i>	56
5.6. Análise dos dados.....	59
5.6.1. Quantificação e normalização dos dados	59
5.6.2. Análise de partição por <i>Density Based Filtering and Markov Clustering</i> (DBF-MCL)	61
5.6.3. Análise do componente principal (PCA).....	61
5.6.4. Análise estatística <i>rank products</i>	62
5.6.5. Análise integrativa do transcriptoma com dados demográficos, clínicos e laboratoriais por estatística hipergeométrica, usando a estratégia dos <i>module maps</i>	62
5.6.6. Análise de enriquecimento funcional	68
6. RESULTADOS	70
6.1. Controle de qualidade das amostras, genotipagem, hibridações e normalização dos <i>microarrays</i>	70

6.2.	Categorização de genes obtidos a partir da filtragem não-informativa	74
6.3.	Categorização de genes diferencialmente expressos obtidos a partir das análises estatísticas pareadas.....	80
6.4.	Módulos significativos a partir da comparação do transcriptoma com dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de tratamento	84
7.	DISCUSSÃO.....	96
8.	CONCLUSÕES.....	107
9.	REFERÊNCIAS.....	109
10.	ANEXOS.....	124

LISTA DE SÍMBOLOS

ADA - American Diabetes Association

ADAM9 - ADAM metallopeptidase domain 9

ADIPOR1 - adiponectin receptor 1

ADM - adrenomedullin

AGEs - Advanced Glycation Products

BCL2L1 - BCL2-like 1

BMP6, BMP7 - bone morphogenetic protein [6], [7]

C2CD4B - C2 calcium-dependent domain containing 4B

CARD9 - caspase recruitment domain family, member 9

CAV1, CAV2 - caveolin [1], [2]

CCL3L3, CCL4, CCL15, CCL20, CCL23 - chemokine (C-C motif) ligand [3-like3], [4], [15], [20], [23]

CCR1, CCR2, CCR3, CCR8 - chemokine (C-C motif) receptor [1], [2], [3], [8]

CD164 - CD164 molecule, sialomucin

CD180 – CD180 antigen

CD33 – CD33 molecule

CD36 - CD36 molecule (thrombospondin receptor)

CD46 - CD46 molecule, complement regulatory protein

CD55 - CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)

CD83 – CD83 molecule

CD9 – CD9 molecule

CDKAL1 - CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1

CDKN1A CDKN2A/2B- cyclin-dependent kinase inhibitor [1A], [2A], [2B]

CLEC1B - C-type lectin domain family 1, member B

CLEC7A - C-type lectin domain family 7, member A

CPH - complexo principal de histocompatibilidade

CR2 - complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2

CRL2 - cytokine receptor-like factor 2

CTLA4 - cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CV – control values

CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL10, CXCL12 - chemokine (C-X-C motif) ligand [1], [2], [3], [4], [5],[10], [12]

CXCR4 - chemokine (C-X-C motif) receptor 4

CYBB - cytochrome b-245, beta polypeptide

DAVID - Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery

DBF-MCL - Density Based Filtering and Markov Clustering

DEFA4, DEFA3 - defensin, alpha [3], [4]

DEPC - Dietilpirocarbonato

DGKB - diacylglycerol kinase, beta 90kDa

DIAMOND – Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group

DKKN - k-nearest neighbours

DM1 – Diabetes mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DMG – Diabetes mellitus gestacional

DNA - Deoxyribonucleic acid

EBDG - Estudo Brasileiro de Diabetes Gestacional

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

EGR1, EGR2 - early growth response [1], [2]

ERBB3 - v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)

ETS1, ETS2- v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog [1], [2]

FADS1 - fatty acid desaturase 1

FDR - false discovery rates

FE – Feature extraction

FOXC1, FOXC2, FOXE1, FOXJ1, FOXO1A, FOXO3A- forkhead box [C1], [C2], [E1], [J1], [O1], [O3A]

FTO - fat mass and obesity associated

GAD65 - glutamic acid decarboxylase

GAL - galanin prepropeptide

GATA2 - GATA binding protein 2

GCK - glucokinase (hexokinase 4)

GCKR - glucokinase (hexokinase 4) regulator

GDM – Gestational diabetes mellitus

GIPR - gastric inhibitory polypeptide receptor

GLIS2 - GLIS family zinc finger 2

GLP1 - glucagon

GNG11 - guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11

GO - Gene Ontology

GRB2 - growth factor receptor-bound protein 2

GWAS - genome-wide association studies

HAPO - Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome

Hb1Ac – Hemoglobina glicada (hemoglobin A1c)

HDL - high density lipoprotein

HES1 - hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)

HHEX-IDE -hematopoietically expressed homeobox

HIF1A - hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)

HLA - human leukocyte antigen

HLA-A, HLA-B HLA-G- major histocompatibility complex, class I, [A], [B], [G]

HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DRB1 - major histocompatibility complex, class II, [DQ alpha 1], [DQ beta 1], [DR beta 3], [DR beta 4], [DR beta 1]

HNFI1A, HNF1B - HNF1 homeobox [A],[B]

HPL - human placental lactogen

HuGe - Human Genome Epidemiology

IA-2 - insulinoma antigen 2

IAA – *Insulin Autoantibody*

ICA - *islet cell antibodies*

Idd - *insulin dependent diabetes (Idd) loci*

IFNG - *interferon, gamma*

IGF2BP2 - *insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2*

IL18R1 - *interleukin 18 receptor 1*

IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL7, IL8, IL23A, IL27 – *interleukin [1, alpha], [1, beta], [2], [4], [6], [7], [8], [23, alpha subunit p19], [27]*

IL1R2 - *interleukin 1 receptor [type II]*

IL1RN - *interleukin 1 receptor antagonist*

IL2RA, IL2RB - *interleukin 2 receptor,[alpha], [beta]*

IL5RA - *interleukin 5 receptor, alpha*

ILF3 - *interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa*

IMC - *índice de massa corpórea*

ImmGen - *Immunological Project*

iNKT - *Invariant Natural Killer T cells*

IRS1 -*insulin receptor substrate 1*

JUNB - *jun B proto-oncogene*

KCNJ11 - *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11*

KCNQ1 - *potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1*

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

KIR2DL4 - *killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4*

KIR2DS4 - *killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4*

KIR3DL2 - *killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 2*

LDLR - *low density lipoprotein receptor*

LEF1 - *lymphoid enhancer-binding factor 1*

LGALS3, LGALS12 - *lectin, galactoside-binding, soluble, [3], [12]*

MADD - *MAP-kinase activating death domain*

MAML2 - mastermind-like 2 (Drosophila)

MAPK8 - mitogen-activated protein kinase 8

MIAME - Minimum Information About a Microarray Experiment

MICA - MHC class I polypeptide-related sequence A

MMLV-RT - Moloney Murine Leukemia Virus – Reverse Transcriptase

MODY - maturity onset diabetes of the Young

MTNR1B - melatonin receptor 1B

MYOD1 - myogenic differentiation 1

NEUROG3 - neurogenin 3

NFKB1A, NFKBIZ - nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, [alpha], [zeta]

NLRC4 - NLR family, CARD domain containing 4

NLRP3 - NLR family, pyrin domain containing 3

NNAT - neuronatin

NOD - nonobese diabetic mice

NOS3 - nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)

NR4A1, NR4A2, NR4A3 - nuclear receptor subfamily 4, group A, [1], [2], [3]

OGTT - Oral Glucose Tolerance Test

OMS - organização mundial da saúde

OSM - oncostatin M

PBMC - peripheral mononuclear blood cells

PCA - Principal Components Analysis

PCR-SSO - polymerase chain reaction - specific sequence of oligonucleotides

PDGFA - platelet-derived growth factor alpha polypeptide

PFP - false positive predictions

PGF - placental growth factor

PHD - phosducin

PIAS2 - protein inhibitor of activated STAT 2

PIK3R1 - phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)

PPARG- peroxidase proliferator activated receptor-gamma

PTGS1, PTGS2 prostaglandin-endoperoxide synthase [1], [2]

PTPN22 - protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid)

RARA - retinoic acid receptor, alpha

RETN - resistin

RGS1 - regulator of G-protein signaling 1

RIN – RNA integrity number

RIPK2 - receptor-interacting serine-threonine kinase 2

RNA - Ribonucleic acid

ROS - reactive oxygen species

RUNX1 - runt-related transcription factor 1

RXRA - retinoid X receptor, alpha

SAPE - Streptavidin – Phycoerytherin

SEC14L2 - SEC14-like 2 (*S. cerevisiae*)

SLC14A1 - solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)

SLC16A3 - solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)

SLC1A5 - solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5

SLC30A8 - solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8

SLC4A1 - solute carrier family 4, anion exchanger, member 1

SLC6A4, SLC6A8, SLC6A10P, SLC6A17 - solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member [4], [8], [10 pseudogene], [17]

SLC8A1 - solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1

SNP - Single-nucleotide polymorphism

SOCS2, SOCS3 - suppressor of cytokine signaling [2], [3]

SOD2 - superoxide dismutase 2, mitochondria

SORT1 - sortilin 1

SOX8 - SRY (sex determining region Y)-box 8

STAT1, STAT3 - signal transducer and activator of transcription [1], [3]

SUS - sistema único de saúde

T1D – Type 1 diabetes

T2D – Type 2 diabetes

TCF7L2 - transcription factor 7-Like 2

TE – Tris-EDTA

TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR10 - toll-like receptor [4], [5], [6], [7], [10]

TNF - tumor necrosis factor

TNFAIP1, TNFAIP3, TNFAIP6 TNFAIP8L2- tumor necrosis factor, alpha-induced protein [1], [3], [6], [8-like 2]

TNFSF10, TNFSF14, TNFRSF17 - tumor necrosis factor (ligand) superfamily, [10], [14], [17]

Treg - Regulatory T cells

VNTR - variable number of tandem repeats

WFS1 - Wolfram syndrome 1 (wolframin)

ZNF101, ZNF181, ZNF184, ZNF248, ZNF250, ZNF397, ZNF442, ZNF443, ZNF575, ZNF578, ZNF582, ZNF773, ZNF775 - zinc finger protein [101], [181], [184], [248], [250], [397], [442], [575], [578], [773], [775]

ZnT8 - zinc transporter 8

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* é considerado como doença metabólica complexa, afetando aproximadamente 346 milhões de pessoas no mundo, o que resulta em 6,4% da população mundial adulta (“International Diabetes Federation”, [S.d.]). No Brasil, segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de diabéticos encontra-se em torno de 4.553.000 acometidos, podendo dobrar entre 2005 e 2030, posicionando o país em oitavo lugar no ranqueamento mundial (“WHO | Facts and figures about diabetes”, [S.d.]). 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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; ROSA; SCHMIDT, MARIA INES, 2008).

O *diabetes mellitus* é definido como conjunto de doenças resultantes da anormalidade do metabolismo dos carboidratos, caracterizadas pela hiperglicemia como consequência da alteração relativa ou absoluta da secreção de insulina, com vários graus de resistência periférica na ação da mesma, decorrente de destruição ou alteração das células beta pancreáticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION., 2011). A sinalização da insulina é um processo dinâmico, regulado por mecanismos complexos, como hormônios produzidos pelo trato gastrointestinal, as incretinas (*GLP1*, *glucagon-like peptide 1* e *GIP*, *gastric inhibitory polypeptide*) e fatores neurais. A ligação da insulina com o seu receptor transmembrana inicia cascata intracelular de fosforilação que controla, particularmente, o crescimento celular e redes metabólicas (SEINO *et al.*, 2011).

Segundo os critérios atuais da OMS e da Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association – ADA*), o diagnóstico da doença é baseado em uma das

seguintes anormalidades: i) níveis de hemoglobina A1C (Hb1Ac) $\geq 5\%$, glicose de jejum ≥ 7 mmol/L, glicose plasmática ao acaso ≥ 11.1 mmol/L, associadas com sintomas de poliúria, polidipsia e perda de peso inexplicada); ii) glicose plasmática ≥ 11.1 mmol/L duas horas depois da carga de glicose em teste oral de tolerância à glicose (*oral glucose tolerance test - OGTT*). (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION., 2011):

Além disso, o *diabetes mellitus* possui diferentes formas de apresentação. Segundo o último relatório da ADA (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION., 2011), a doença é classificada 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; doenças 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

1.1. *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1)

O *diabetes mellitus* tipo 1 é caracterizado pela destruição das células beta pancreáticas levando à deficiência absoluta de insulina. Isso ocorre devido à destruição autoimune das células beta pancreáticas (tipo 1A) ou por causas desconhecidas (idiopática ou tipo 1B) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION., 2011).

O projeto DIAMOND da OMS busca avaliar a incidência do DM1 no mundo, que tem sido estimada de 5-10% de todos os casos de diabetes (KARVONEN *et al.*, 2000; DIAMOND PROJECT GROUP., 2006). Uma compilação recente de diversos estudos e relatórios indicam que a incidência do DM1 tem aumentado de 2-5% no mundo todo e que a prevalência do DM1 é de aproximadamente 1 em 300 nos EUA aos 18 anos de idade

(MAAHS *et al.*, 2010). Dados disponíveis para o DM1 no Brasil foram estimados em 7,6 indivíduos afetados em 100.000 habitantes (FERREIRA *et al.*, 1993; LISBÔA *et al.*, 1998).

1.1.1. Patogênese do *diabetes mellitus* tipo 1

Devido à destruição das células beta, no DM1 ocorre perda progressiva da secreção insulínica, que pode ser avaliada pelo peptídeo C ao longo do tempo (Figura 1). A perda celular gera sintomas específicos como insulite e cetoacidose (EISENBARTH, GEORGE S; JEFFREY, 2008).

Figura 1. Gráfico representativo dos eventos associados com a perda da massa de células beta pancreáticas ao longo do tempo devido à mecanismos autoimunes no DM 1. Adaptado de (EISENBARTH, GEORGE S; JEFFREY, 2008)

Mais de 90% dos pacientes com DM1 apresentam os autoanticorpos ICA (*islet cell antibodies*), GAD65 (*glutamic acid decarboxylase*), IA-2 (*insulinoma antigen 2*) ou IAA (*insulin autoantibodies*), por ocasião do diagnóstico (NOTKINS; LERNMARK, A, 2001). Recentemente, foi relatado o anticorpo contra o antígeno da família dos carreadores solúveis

tipo 8, o *zinc transporter 8* (*ZnT8*, também designado *SLC30A8*) em associação com o DM1 nas fases mais tardias da doença, sendo que nas fases iniciais da doença apenas de 1.8% a 5.8% dos pacientes não apresentam autoanticorpos contra esses cinco autoantígenos (WENZLAU *et al.*, 2007). A ausência de autoanticorpos por ocasião do diagnóstico não significa que a destruição das células betas não seja mediada por processos autoimunes. Assim, é possível que outros autoanticorpos ainda não associados ao diabetes sejam descobertos.

Dentre os autoanticorpos, o IA-2 parece ser o mais específico relacionado à progressão do DM1, sendo também o mais persistente. Embora não seja específico da autoimunidade, acredita-se que o autoanticorpo GAD65 seja o marcador mais freqüente, enquanto os autoanticorpos IA-2 e IAA sejam marcadores mais específicos de morte de célula beta (BARKER *et al.*, 2004). O autoanticorpo ZnT8 aparece, geralmente, após 3 anos de idade, apresentando aumento de frequência na adolescência (WENZLAU *et al.*, 2007). Em adição, os títulos de todos os autoanticorpos parecem ser importantes, com altos níveis de predição de risco de autoimunidade persistente no DM1, especialmente em combinação com genótipo de susceptibilidade HLA de classe II de alto risco (SAVOLA *et al.*, 2001).

Células dendríticas, macrófagos e linfócitos estão envolvidos no processo patogênico por meio de vários mecanismos implicados na perda da tolerância imunológica aos autoantígenos, incluindo:

- 1) hipoeexpressão da insulina no timo durante a expressão gênica promíscua dos antígenos (CHENTOUFI *et al.*, 2008; TISCH; WANG, B., 2008).
- 2) Apresentação de autoantígenos mediada por moléculas codificadas pelos haplótipos *HLA-DRB1*04-DQB1:03:02* e *HLA-DR31*03-DQB1*02:01*, resultando no desenvolvimento dos autoanticorpos IAA e GAD65 (KNIP, MIKAEL; SILJANDER, 2008).

- 3) Desregulação da resposta imune mediada pela expressão desregulada de moléculas de superfície (*IL2RA*, *IL2RB* e *CTLA-4*) ou a desregulação de sinais intracelulares (*IL2* e *CTLA-4*) (TODD, 2010).
- 4) Número diminuído de células T regulatórias (Treg) (SIA, 2006).
- 5) Número diminuído de células iNKT (NOVAK; LEHUEN, 2011).
- 6) Perda da função de moléculas envolvidas na resposta imune inata (CIPOLLETTA *et al.*, 2005; KARUMUTHIL-MELETHIL *et al.*, 2008).

1.1.2. Genética do *diabetes mellitus* tipo 1

A herança do DM1 permaneceu desconhecida até a identificação de duas regiões gênicas de susceptibilidade: os genes HLA no cromossomo 6 (SINGAL; BLAJCHMAN, 1973; NERUP, J *et al.*, 1974) e a região do gene da insulina no cromossomo 11p15 (BELL, G I *et al.*, 1984). Em um contexto histórico, diversos locos de susceptibilidade (risco relativo) ao DM1 foram identificados desde 2001 (Figura 2).

Figura 2. Valor preditivo e datas da identificação dos locos de susceptibilidade ao DM1. Adaptado de (POCIOT et al., 2010).

Os genes *HLA* estão localizados no complexo principal de histocompatibilidade (CPH) humano, codificando moléculas com importante participação no sistema imune. Essas moléculas são heterodímeros cuja função principal é apresentar peptídeos antigênicos a células T, um passo importante na resposta imune normal contra infecções. Existem duas classes principais de moléculas HLA, as de classe I estão presentes em todas as células nucleadas, enquanto que as moléculas de classe II estão presentes, especialmente, nas células B, macrófagos, células dendríticas e células T ativadas no sistema imune. O receptor de célula T reconhece antígenos estranhos e autoantígenos, quando apresentados pelas moléculas HLA de classe I, no caso aos linfócitos TCD8+, ou ainda, quando apresentados no contexto das moléculas HLA de classe II, no caso aos linfócitos T CD4+.

Embora estudo recente, englobando grande quantidade de pacientes, tenha relatado que os grupos de alelos *HLA-A*24* e *HLA-B*39* contribuam para o risco ao DM1 (NEJENTSEV *et al.*, 2007), os genes *HLA-DQ* e *HLA-DR* são considerados os mais importantes na suscetibilidade (TODD, 1995; NOBLE *et al.*, 1996; REDONDO *et al.*, 2001), contribuindo com até 50% na susceptibilidade genética à doença (REDONDO; EISENBARTH, 2002), sendo que o loco HLA-DR pode contribuir um efeito aditivo em HLA-DQ (KOCKUM *et al.*, 1999).

O complexo gênico *HLA-DQ* contem os genes que codificam as cadeias alfa e beta, codificando os alelos *HLA-DQA1*0301-B1*0302* (DQ8) e *HLA-DQA1*0501-B1*0201* (DQ2) que formam os haplótipos associados com alto risco para o DM1. HLA-DQ8 é altamente ligado ao HLA-DR4 e HLA-DQ2 ao HLA-DR3. Aproximadamente 90% dos indivíduos com DM1 possui pelo menos um desses alelos HLA-DQ, comparado com 20% na população geral. (ILONEN *et al.*, 2002; HIRSCHHORN, 2003). Em adição aos alelos HLA-DQ associados com aumento do risco para DM1, existem alelos que reduzem o risco ou até mesmo protegem contra a doença. Os alelos *HLA-DQA1*0102-B1*0602* conferem risco muito baixo ao DM1, até mesmo quando combinado com alelos de alto risco (ILONEN *et al.*, 2002).

Genótipos HLA têm sido usados para selecionar populações de risco em estudos de prospectivos para a predição do aparecimento do diabetes. Entre parentes de primeiro e segundo grau, genótipos HLA de alto risco são associados com aumento da frequência de autoanticorpos contra ilhotas (REDONDO *et al.*, 2006). Além disso, genótipos HLA específicos também tem sido associados a diferentes autoanticorpos, incluindo HLA-DQ2 com GAD65, e HLA-DQ8 com IA-2 e IAA (GRAHAM *et al.*, 2002; KNIP, MIKAEL *et al.*, 2002). De forma similar, vários locos de susceptibilidade foram identificados em camundongos NOD (*Idd1-Idd26*) (CHENTOUFI *et al.*, 2008).

Vários fatores genéticos não-HLA são conhecidos por afetar o risco ao DM1. O gene da insulina contém algumas repetições de nucleotídeos *in tandem* (*variable number of tandem repeats*-VNTR) na região promotora do gene, associados com a expressão gênica no timo durante a expressão gênica promíscua (ANJOS; POLYCHRONAKOS, CONSTANTIN, 2004). O gene *CTLA4* (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) codifica um receptor expresso por células T ativadas que limita a proliferação de células T ativadas. Mutações nesse gene podem representar papel importante na autoimunidade (REDONDO; EISENBARTH, 2002). Polimorfismos no gene *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase N22*) que codifica uma fosfatase que suprime a ativação das células T, tem sido demonstrada como um importante fator de risco para o DM1 e outras doenças autoimunes (BOTTINI *et al.*, 2004; SMYTH, D. *et al.*, 2004). Juntos, os genes as VNTRs do gene da insulina e os polimorfismos dos genes *CTLA4* e *PTPN22* conferem cerca de 15% do risco genético ao DM1 (ANJOS; POLYCHRONAKOS, CONSTANTIN, 2004). Em adição, aproximadamente 15 possíveis genes com menor poder de susceptibilidade também têm sido descritos, identificando diversos genes e regiões gênicas em estudos de ligação, avaliando todo o genoma por GWAS (*genome wide association studies*) (BARRETT *et al.*, 2009; POCIOT *et al.*, 2010; PLAGNOL *et al.*, 2011).

Além dos genes identificados por GWAS, outra estratégia para identificar genes associados com o DM1 tem sido a avaliação dos perfis transcricionais em humanos e modelos animais (GRINBERG-BLEYER *et al.*, 2010; FORNARI *et al.*, 2011), avaliando células mononucleares periféricas (RASSI *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2011), órgãos linfóides e células beta pancreáticas (PLANAS *et al.*, 2010) e células oriundas de sangue total (REYNIER *et al.*, 2010) do pacientes com DM1, identificando outras regiões além daquelas definidas por GWAS.

1.2. *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM-2)

O DM2 é considerado como desordem metabólica altamente complexa e heterogênea, caracterizada por hiperglicemia e dislipidemia, pela combinação de fatores ambientais, e ainda, predisposição genética. Essa forma de manifestação do diabetes resulta de efeitos duplos de ação e secreção de insulina. A ação defeituosa da insulina diminui a captação de glicose em tecidos metabolicamente ativos. Já o defeito na secreção de insulina implica na diminuição de níveis circulantes de insulina no sangue e exacerba as consequências da ação defeituosa da insulina (UNGER, 2007).

Embora a resistência à insulina e a progressiva disfunção das células beta pancreáticas já tenham sido estabelecidas como fatores fundamentais na patogenia do DM2 (KAHN, C R, 1994), os eventos moleculares específicos que afetam a sensibilidade à insulina e/ou a funções das células beta ainda permanecem desconhecidos.

A prevalência do DM2 está aumentando no mundo todo, apresentando índices alarmantes nos EUA (BECKLES *et al.*, 2011). Acredita-se que o DM2 esteja se tornando a maior epidemia global do século 21: Aproximadamente 200 milhões de pessoas já são acometidas por essa forma de manifestação da doença no mundo todo, com projeção de aumento de até 50% nas próximas duas décadas (“WHO | Facts and figures about diabetes”, [S.d.]). Um estudo multicêntrico realizado nas nove maiores cidades brasileiras aponta a prevalência de DM2 de 7,6% em indivíduos de 30 a 69 anos (MALERBI; FRANCO, 1992). Indivíduos da mesma faixa etária na cidade de Ribeirão Preto apresentaram taxas de 12,0% em homens e 12,1% em mulheres entre 1986 e 1988 (TORQUATO *et al.*, 2003).

1.2.1. Patogênese do *diabetes mellitus* tipo 2

Muitos estudos sugerem que a disfunção das células beta resulte de exposição prolongada a altos níveis de glicose, ácido graxo, ou da combinação de ambos (EVANS *et al.*, 2003). As células beta são particularmente sensíveis às espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) por apresentarem baixos níveis de enzimas antioxidantes (catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase). Portanto, o estresse oxidativo acarreta sério comprometimento das mitocôndrias e bloqueio da secreção de insulina (VALKO *et al.*, 2007).

O diabetes é doença relacionada com alto nível de estresse oxidativo, resultante principalmente da hiperglicemia e também da diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, como SOD (superóxido dismutase), catalase e glutathiona redutase (SEGHROUCHNI *et al.*, 2002). Além disso, em pacientes diabéticos, grande quantidade de radicais livres também pode ser gerada pela formação de produtos avançados de glicação (*advanced glycation products* - AGEs). A glicação não-enzimática é uma mudança pós-traducional, em que o grupo carbonila do açúcar é adicionado ao grupo amino da proteína, acarretando a formação de uma glicosamina, que inutiliza a proteína recém-traduzida. Após essa primeira etapa, a glicosamina sofre algumas modificações que levam à formação de produtos Amadori que representam o primeiro estágio da glicação, ainda revertido dependendo da sua quantidade na célula. Quando esses produtos sofrem outras modificações irreversíveis, incluindo desidratação, oxidação, condensação, entre outros, ocorre a formação de AGEs (SUJI; SIVAKAMI, 2006). Apesar de haver diversos processos envolvidos na geração de ROS, a hiperglicemia parece ser seu formador principal.

Alguns estudos demonstraram que pacientes com diabetes, particularmente DM-2, podem também apresentar defesa antioxidante deficiente em relação aos indivíduos normais, o que acarreta aumento, não só na geração de ROS, como também na quantidade de danos

causados pelos mesmos às macromoléculas, como DNA (NISHIKAWA *et al.*, 2000; BLASIAK *et al.*, 2004). Considerando que no diabetes, diversos mecanismos estejam associados com a formação de radicais livres, envolvendo diversas cascatas gênicas relacionadas ao processamento do dano oxidativo, muitas delas ainda não completamente elucidadas.

Entretanto, os mecanismos responsáveis pelo risco aumentado ao desenvolvimento do DM2 ainda são pouco conhecidos, sendo que evidências recentes têm gerado a hipótese de o DM2 seria uma doença inflamatória, com influência de citocinas e quimiocinas, em especial *IL1B* (DONATH; SHOELSON, 2011)

1.2.2. Genética do *diabetes mellitus* tipo 2

A genética do DM2 é recente, com os estudos para avaliação de suscetibilidade genéticas realizados a partir de 2000, em estudos múltiplos do gene candidato e associações em larga escala, apresentando maior representatividade nos últimos cinco anos com a estratégia de GWAS (PROKOPENKO *et al.*, 2008) (Figura 3).

Figura 3. Valor preditivo e datas da identificação dos alelos de susceptibilidade ao DM2. Adaptado PROKOPENKO (2008).

Os dados obtidos de GWAS têm identificado inúmeras variantes genéticas associadas com a susceptibilidade ao DM2 (VOIGHT *et al.*, 2010). Os dados mais recentes apontam 44 locos validados associados com o DM2 por GWAS (WHEELER; BARROSO, 2011). Estudos colaborativos que analisam esses dados, como o MAGIC (*meta-analysis of glucose and insulin-related traits consortium*) têm associado múltiplos locos identificados por GWAS com variantes que influenciam traços glicêmicos de forma contínua em indivíduos não-diabéticos, agrupando-os em categorias, tais como genes relacionados com o processamento anormal de insulina (*MADD*), altos níveis de pró-insulina e baixa secreção de insulina (*TCF7L2*, *SLC30A8*, *GIPR*, *C2CD4B*), e anormalidades no processo de secreção insulínica (*MTNR1B*, *FADS1*, *DGKB*, *GCK*) (BILLINGS; FLOREZ, JOSE C, 2010). Entre as funções identificadas, a grande maioria dos locos afeta a secreção de insulina (PERRY;

FRAYLING, 2008), o que aponta como desafio atual a necessidade de identificar locos relacionados com resistência à insulina (FLOREZ, 2008; MCCARTHY; ZEGGINI, 2009).

Além disso, maioria dos polimorfismos gênicos descritos para o DM2 possui pequenos efeitos sobre o risco de DM2. Estudos mostram que o valor preditivo para o diagnóstico do DM2 pode ser melhorado através de combinações de múltiplas variantes de risco comuns, ao invés de utilizar essas variantes separadamente (WEEDON *et al.*, 2006; HOEK, VAN *et al.*, 2008). A tabela I mostra alguns dos principais genes associados ao DM2 que têm sido utilizados para construção desses modelos de predição.

Tabela 1. Principais genes, variações genéticas e função dos genes associados com a susceptibilidade ao DM2. Modificado de (BILLINGS; FLOREZ, JOSE C, 2010; BUNT, VAN DE; GLOYN, 2010).

Gene	Marcador (SNP)	Cromossomo	Tipo de mutação	Alelo	Função descrita
<i>PPARG</i> (peroxidase proliferator activated receptor-gamma)	rs1801282	3	Missense: Pro12Ala	C/G	Receptor nuclear que regula adipogênese, alvo de drogas tiazolidinedionas
<i>KCNJ</i> (potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J)	rs5219/ rs757110	11	Missense: Glu23Lys/ Ala1369Ser	T/ C G/ T	Subunidade do canal de potássio (K-ATP), responsável pela regulação da secreção de insulina e alvo de drogas sulfoniluréias
<i>TCF7L2</i> (transcription factor 7-Like 2)	rs7903146	10	Intrônico	T/ C	Apoptose, proliferação de células β , diminuição da secreção insulínica
<i>SLC30A8</i> (solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8)	rs13266634	8	Missense: Arg325Trp	C/ T	Processamento e cristalização da insulina. Variantes afetam a produção de proteínas <i>zinc</i>

<i>finger</i>					
<i>HHEX-IDE</i> (hematopoietically expressed homeobox)	rs1111875	10	7.7 kb <i>downstream</i>	C/ T	Fator de transcrição/ enzima envolvida na degradação da insulina
<i>FTO</i> (fat mass and obesity associated)	rs8050136	16	Intrônico	A/ C	Proteína nuclear que cataliza metilação oxidativa
<i>KCNQ1</i> (potassium voltage-gated channel, <i>KQT-like subfamily,</i> <i>member 1</i>)	rs2237892c	11	Intrônico	C/ T	Canal de potássio que atua na fase de repolarização do potencial de ação no músculo cardíaco, também expresso no pâncreas
<i>HNF1B</i> (<i>HNF1</i> <i>homeobox B</i>)	rs757210	17	Intrônico	A/ G	Fator de transcrição envolvido no desenvolvimento do pâncreas
<i>IRS1</i> (insulin receptor substrate 1)	rs2943641	2	502 kb upstream	C/ T	Ação no metabolismo da glicose, polimorfismo afeta a via de sinalização da insulina
<i>GCKR</i> (glucokinase (hexokinase 4) regulator)	rs780094	2	Intrônico	C/ T	Regulador de GCK, molécula envolvida na produção de insulina

Considerando todos os genes associados ao DM2, o TCF7L2 (*transcription factor 7-like 2* (*T-cell specific, HMG-box*)) confere maior risco ao desenvolvimento da doença (OWEN; MCCARTHY, 2007; MOORE; FLOREZ, JOSE C, 2008). As variantes de risco desse gene

apresentam polimorfismos na região não-codificadora (intrônico) que parece afetar a expressão gênica. Estudos com DNA de ilhotas humanas usando seqüenciamento de alta performance mostraram que os alelos de risco associados ao T2D apresentam um SNP (*single-nucleotide polymorphism*) (rs7903146) localizado em uma região seletiva de abertura da cromatina nas ilhotas (GAULTON *et al.*, 2010). Esse gene codifica um fator de transcrição do complexo beta-catenina que atua na via de sinalização *Wnt*, que é responsável pela sobrevivência e proliferação das células beta pancreáticas, e consequentemente, no processo de homeostase da glicose. Acredita-se que esse gene afete a produção de insulina assim como a ação de hormônios incretínicos, influenciando a expressão do gene *GLP1* (WELTERS; KULKARNI, 2008).

O momento atual da pesquisa é apontado como a era pós-GWAS, no qual novas informações fornecidas por esses estudos tendem a ser cruzados com dados de expressão para gerar novos marcadores (GORLOV *et al.*, 2009). Um estudo recente comparando resultados identificados por GWAS com microarrays em indivíduos e modelos animais de DM2 identificaram centenas de SNPs associados ao diabetes como diferencialmente expressos em pâncreas, fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (PARIKH, HEMANG *et al.*, 2009; ZHONG *et al.*, 2010).

1.3. *Diabetes mellitus* gestacional (DMG)

O DMG é definido como intolerância variável à glicose durante a gravidez, sendo o diagnóstico baseado no teste OGTT (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION., 2011).

A prevalência do DMG depende da população estudada e dos métodos de rastreamento usados. Isso ocorre porque a prevalência do DMG reflete a do DM2, já que

ambas resultam de uma combinação do aumento da resistência insulínica com secreção de insulina defeituosa (HUNT; SCHULLER, 2007). Nos EUA, o DMG é relatado em 4% de todas as gravidezes, mas a prevalência pode variar de 1 a 14% dependendo da sub-população avaliada (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION., 2011). Algumas populações consideradas de alto risco mostram prevalências superiores, como nativos Norte-Americanos, Bahraini e Asiáticos (HUNT, K. J.; SCHULLER, 2007). Um exemplo é a prevalência no Qatar (16,3%), conhecida como uma das mais altas do mundo (BENER *et al.*, 2011). Nos EUA, a população ancestral também possui um impacto na prevalência do DMG, sendo 4,1% em Caucasianas, 4,3% em Afro-Americanas, 7,0% em Latinas e 9,7% em Asiáticas (ESAKOFF *et al.*, 2005). No Brasil, dados do Estudo Brasileiro de Diabetes Gestacional (EBDG) apontam prevalência de 7,6% de DMG (SCHMIDT, M I *et al.*, 2000; Ministério da Saúde, 2001).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de DMG são: idade materna avançada, peso corporal aumentado, alta paridade, histórico prévio de infante macrossômico e histórico familiar de diabetes. (ALBERTI; ZIMMET, 1998; BEN-HAROUSH *et al.*, 2004; ROMAN *et al.*, 2004; NASSAR *et al.*, 2006). A obesidade também é considerada como fator de risco ao DMG, com uma estimativa de que a cada kg m⁻² acima do índice de massa corpórea (IMC) da gestante há um aumento de 0,92% (TORLONI *et al.*, 2009). Um estudo multicêntrico com mais de 25 mil pacientes, o *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome* (HAPO) mostrou a associação dos níveis de glicose com peso aumentado do infante ao nascimento, além de complicações (METZGER *et al.*, 2008; MULLA *et al.*, 2010)

O mau controle glicêmico durante a gestação está associado com maior incidência de abortos espontâneos, infecções urinárias, hipertensão arterial, partos pré-termos e indicação de cesáreas. O quadro de hiperglicemia durante a gestação também está associado com aumento da mortalidade fetal, caracterizada por maior frequência de malformações, macrossomia,

hipoglicemia, hiperbilirrubinemia, policitemia, hipocalcemia, hipomagneemia, cardiomiopatia hipertrófica, síndrome do desconforto respiratório do recém-nascido e morte fetal (CROWTHER *et al.*, 2005; MULLA *et al.*, 2010).

1.3.1. Patogênese do *diabetes mellitus* gestacional

Durante gravidez, o metabolismo de carboidratos muda gradualmente para atender às demandas da mãe e do feto em crescimento, no qual os níveis de glicose em jejum decaem conforme os níveis de glicose hepática aumentam. Esse mecanismo resulta em decréscimo natural na sensibilidade hepática à insulina (LAIN; CATALANO, 2007). Normalmente, as células beta pancreáticas aumentam a secreção insulínica para balancear esse processo de resistência insulínica na gravidez, com efeitos no metabolismo como alterações hormonais como o *human placental lactogen* (HPL), a progesterona, a prolactina e o cortisol, além da produção de citocinas (BUCHANAN *et al.*, 2007; LAIN; CATALANO, 2007). Além disso, dois processos são conhecidos como reguladores da glicose na gravidez, efeitos desensibilizadores que hormônios placentários exercem na insulina e o aumento da produção da produção da mesma (BUCHANAN; KJOS, 2003; BUCHANAN; XIANG, A. H., 2005).

Em contrapartida, na mulher diagnosticada com DMG, a produção básica de glicose hepática não difere de mulheres com tolerância à glicose normal, no entanto, as concentrações de glicose em jejum são mais altas. Assim, no caso do DMG, ocorre o suprimento inadequado de insulina às demandas teciduais a fim de regular a glicose sanguínea (LAIN; CATALANO, 2007). Entre os possíveis processos que atuam na resistência grave à insulina são relatados a presença de inflamação subclínica, o aumento de hormônios placentários, secreção de adiponectina reduzida e excesso de lipólise (BARBOUR *et al.*, 2007). É importante ressaltar o papel da inflamação subclínica no desenvolvimento do diabetes. A base molecular para a

relação entre a inflamação e o diabetes está relacionada à ação de citocinas, tais como IL1 (*interleukin-1*), IL6 (*interleukin-6*) e TNF (*tumor necrosis factor*), que induzem a resistência à insulina e estimula a resposta inflamatória de fase aguda. Considerando que diversas citocinas são aumentadas durante a gravidez, esse processo tem sido considerado como fator determinante no desenvolvimento do DMG (DEVARAJ *et al.*, 2009).

Da mesma forma que o DM2, o stress oxidativo também tem sido associado ao DMG, particularmente a peroxidação de lipídeos, porém com resultados controversos e ainda em estágio preliminar (CHEN *et al.*, 2010). No entanto, sabe-se que níveis de tióis encontram-se aumentados em cordão umbilical na presença do DMG (DEY *et al.*, 2008).

1.3.2. Genética do *diabetes mellitus* gestacional

O DMG possui poucos estudos, em geral, por comparação aos outros tipos de diabetes. Algumas mutações gênicas na forma monogênica do diabetes, *maturity onset diabetes of the Young* (MODY), parecem aumentar o risco de DMG em algumas populações. Um estudo identificou um polimorfismo em comum na região promotora do gene *GCK* e *HNF1A* em comum com MODY na população Escandinávia (SHAAT *et al.*, 2006).

Diversas evidências mostram a relação entre o DM2 e o DMG, o que confere caráter poligênico ao DMG. Sabe-se que a incidência de desenvolver DM2 é aumentada em mulheres com DMG (LAUENBORG *et al.*, 2004) e que mulheres com histórico familiar de DM2 têm risco aumentado de desenvolver DMG (GUNDERSON *et al.*, 2011). Diversos fatores genéticos associados ao DM2 são conhecidos por contribuir para o desenvolvimento do DMG, em especial, variantes de onze genes: *PPARG*, *KCNJ11*, *TCF7L2*, *CDKAL1*, *SLC30A8*, *CDKN2A/2B*, *HHEX/IDE*, *IGF2BP2*, *TCF2*, *WFS1* e *FTO* (BEN-HAROUSH *et al.*, 2004; SHAAT, NAEL; GROOP, LEIF, 2007; LAUENBORG *et al.*, 2009). A Figura 4 mostra a

análise combinatória de risco no DMG, destacando os 11 principais genes também associados ao DM2.

Figura 4. Distribuição de alelos de risco previamente associados ao DM2 em indivíduos com intolerância à glicose e no DMG. O efeito do risco é aumentado pela combinação de 11 genes principais. Adaptado de LAUENBORG (2009).

Outro aspecto na genética do DMG é que antígenos HLA-DR3 e DR4 são mais freqüentes em mulheres com DMG do que em mulheres com gravidez normal (FREINKEL *et al.*, 1986). Ainda, alelos de histocompatibilidade associados com a pré-eclampsia como *HLA-DR7/DQ2* (*DQA1*0201-DRB1*0201*) também estão associados com DMG (VAMBERGUE *et al.*, 1997). No entanto, a relação do DM1 com DMG é incerta. Até o momento, os haplótipos HLA identificados têm sido diferentes, enquanto sítios polimórficos do gene MICA já associados ao DM1 foram observados em mulheres com DMG (TÖRN *et al.*, 2004).

Também existem evidências de que alguns pacientes possam apresentar uma forma de DMG autoimune (MURGIA *et al.*, 2008; LAPOLLA *et al.*, 2009).

Um estudo do transcriptoma por comparação entre DM1 e DMG apontou genes diferencialmente expressos associados com o metabolismo de lipídeos na placenta (RADAELLI *et al.*, 2009). Um estudo mais recente com sangue total de pacientes com DMG, em relação aos controles, identificou diversas assinaturas em comum com a placenta (ZHAO *et al.*, 2011). Esse mesmo estudo identificou a alteração de expressão de genes de importância na gravidez, como o *HLA-G*.

1.4. Análise Bioinformática aplicada ao *diabetes*

Na última década, houve a emergência de GWAS, no entanto, apesar do sucesso desse procedimento, o poder preditivo dos SNPs identificados permanece baixo em doenças complexas. A maioria dos GWAS analisa os locos, independentemente das variantes causais, no entanto, esse tipo de procedimento pode gerar falsas associações devido à estrutura da população, e ainda, à dificuldade de distinguir variantes causais de marcadores em forte desequilíbrio de ligação com essas variantes, fazendo com que apenas parte dos SNPs identificados sejam validados. Além disso, os SNPs identificados ainda podem apresentar variação fenotípica. Recentemente, métodos analíticos mais sofisticados têm sido usados para melhorar a análise, integrando dados de expressão gênica na busca da identificação da variação identificada em vias ou funções associadas. Existem, atualmente, inúmeros métodos que têm sido criados para análises de associação entre perfis de expressão e genótipos baseados em SNPs que, em geral, utilizam Z-score, ranqueamento ou método de *Fisher*. Essas evidências ressaltam a necessidade da integração de estratégias diferentes para o melhor entendimento do papel de variações genéticas em doenças complexas (XIONG, 2012).

Em adição, novas estratégias de uso com dados de transcriptoma, como os *module maps* representam uma promessa para delineamento de padrões comuns de expressão gênica em tecidos heterogêneos e processos alterados em doenças. Os módulos são determinados por comparação de *gene sets* relevantes biologicamente com dados de expressão, extraindo uma subclasse de genes que são significativamente coexpressos. Esses módulos são conhecidos como uma maneira de refletir os processos biológicos envolvidos, uma vez que eles são diretamente relacionados com a expressão atual nas amostras. Os padrões dos módulos podem então ser comparados com tipos teciduais ou variantes amostrais para buscar assinaturas similares, indicando processos comuns (HANAUER *et al.*, 2007).

Um estudo recentemente publicado demonstra a análise de *module maps* no câncer. Foram utilizados 2.000 experimentos de *microarrays* de diversos tipos de cânceres e anotados de acordo com a relevância de informações diagnósticas e prognósticas. Partindo de aproximadamente 3.000 *gene sets* obtidos de múltiplas fontes, os autores obtiveram 456 módulos. Os achados desse estudo revelaram padrões comuns de expressão gênica entre cânceres não relacionados, fornecendo informações úteis na separação de amostras (SEGAL *et al.*, 2004). No presente trabalho, essa estratégia foi empregada pela primeira vez no diabetes, além da busca de genes identificados por GWAS e meta-análises do diabetes.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

As três principais formas de diabetes mellitus (DM1, DM2 e DMG) podem ser caracterizadas pela análise do transcriptoma, apresentando perfis de expressão gênica compartilhados e específicos para cada variante, podendo ser influenciados por variáveis demográficas, clínicas e laboratoriais, e ainda, por fatores patogênicos e tipo de tratamento instituído.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Realizar análise integrativa das três formas principais do *diabetes mellitus*, DM1, DM2 e DMG, comparando o transcriptoma de células mononucleares do sangue periférico com características demográficas, clínicas, laboratoriais e terapêuticas por meio de ferramentas específicas de bioinformática.

3.2. Específicos

- 1) Caracterizar perfis de expressão gênica de células mononucleares do sangue periférico (perfis do transcriptoma) em DM1, DM2 e DMG,
- 2) Caracterizar perfis de expressão gênica em cada forma de apresentação da doença,
- 3) Comparar os perfis transcricionais obtidos em DM1, DM2 e DMG com assinaturas de genes previamente associados com células (Linfócitos B e T, macrófagos, Tregs, células dendriticas e iNKT) envolvidas na patogenia do diabetes ,
- 4) Buscar genes previamente associados com o diabetes e suas complicações em bancos de dados específicos,
- 5) Identificar e utilizar características clínicas, demográficas, laboratoriais e tipo de tratamento como forma de criar subgrupos de pacientes,

- 6) Comparar os valores de expressão dos genes identificados que foram previamente anotados (genes dos subtipos celulares imunes e associados ao diabetes) com as características específicas dos pacientes (análise de *module maps*).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DA ANÁLISE IN SILICO

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DA ANÁLISE *IN SILICO*

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Casuística e população de estudo

Todos os pacientes foram diagnosticados e acompanhados na Divisão de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Brasil, segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA). A etapa da seleção dos pacientes foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Milton César Foss e da Prof Dr^a Maria Cristina Foss Freitas, ambos do departamento de Clínica Médica.

Para o presente estudo foram selecionados 56 pacientes diabéticos. Entre eles, 19 eram acometidos de DM1 (7 mulheres/12 homens), com idade variando de 18-36 anos; 20 pacientes com DM2 (13 mulheres/ 7 homens) entre 41-72 anos e 17 pacientes com DMG, de 23 a 40 anos. A cópia do termo de consentimento do livre-esclarecido e do protocolo de estudo aprovado pelo comitê de ética local (Protocolo # 9153/2008) encontram-se em anexo (ANEXO A e ANEXO B, respectivamente).

Os critérios de exclusão foram baseados em: episódios recentes de cetoacidose, nefropatia ativa, retinopatia proliferativa, presença de pé diabético, níveis HDL acima do normal e doença cardiovascular diagnosticada. Foram incluídos pacientes em fase de tratamento. Dessa forma, os pacientes com DM1 e DMG foram tratados com insulina, enquanto pacientes com DM2 foram tratados com insulina em combinação com metformina, captopril, aspirina, atorvastatina e hidroclorotiazida.

As características individuais dos pacientes foram consideradas para análises posteriores (construção dos *array sets* que compõe uma parte da análise de *module maps*). Para tal, são inseridos dados qualitativos binários (0 e 1). As características tais como subtipo da doença, sexo, uso de insulina, uso de metformina e uso de outras medicações fazem parte

dessa categoria. No entanto, dados demográficos (idade), parâmetros clínicos (tempo de doença, obesidade, tempo de gestação e número de gravidezes) e laboratoriais (glicose sérica e níveis de Hb1Ac) são dados quantitativos. Dessa forma, foram calculados valores das médias de todos os pacientes das três formas de apresentação da doença. Pacientes acima da média são marcados com um (1), e abaixo, zero (0). As tabelas com as informações de cada paciente de DM1, DM2 e DMG, encontram-se em anexo (ANEXO C, ANEXO D e ANEXO E, respectivamente). A tabela I apresenta as médias e desvio padrão das categorias quantitativas (não-binárias) de todos os pacientes estudados. Finalmente, a figura 5 contém uma figura esquemática em forma de *heatmap* com todas as características da forma que foram utilizadas para análises posteriores. Os valores um (1) estão representados em cinza e os valores zero (0) em branco (valor nulo).

Tabela 2. Média e desvio padrão de características quantitativas (não-binárias) de todos os pacientes, utilizadas na construção da variável *array set* para análise de *module maps*.

	Idade (anos)	Tempo de doença (anos)	Glicose (mg/dL)	Hb1Ac	Tempo de gestação (semanas)	Número de gestação
Média de todos os pacientes	37 ± 14	11 ± 5,3	130,7 ± 75,4	8,9 ± 1,8	30,5 ± 5,7	2 ± 1

Figura 5. *Heatmap* representativo das variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e terapêuticas utilizadas nas análises bioinformáticas deste trabalho.

5.2. Coleta de sangue e isolamento de células mononucleares do sangue periférico

Foram obtidos 20 mL de sangue em tubo com EDTA (1,8 mg/mL) (Sigma, St. Louis, MO), mantido sob refrigeração até o momento da utilização para o isolamento de células mononucleares. A separação das PBMCs foi realizada no mesmo dia da coleta, e todas as etapas foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Brasil. Nessa etapa foi utilizado o método de centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque ($d=1,077$) (Sigma), de acordo com procedimento previamente descrito (BÖYUM, 1968).

As etapas do processo da separação incluíram a adição do mesmo volume de salina estéril (1:1), com a deposição da solução resultante sobre o Ficoll-Hypaque, na proporção (2:1). As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a $1042 \times g$ – RCF (2300 rpm) à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o anel de células mononucleares, localizado na interface do Ficoll-Hypaque, foi retirado com auxílio de uma pipeta, lavado por duas vezes em solução salina estéril, e as células foram imediatamente submetidas ao processo de extração de ácidos nucléicos.

5.3. Extração de RNA e DNA de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1, tipo 2 e gestacional

Os ácidos nucléicos (DNA e RNA) foram extraídos simultaneamente usando o reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA), que consiste de uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Durante as etapas do processamento, após a adição de clorofórmio (Merck), o RNA permanece na fase aquosa, sendo obtido por precipitação em isopropanol (Merck). Já o DNA foi recuperado, após a remoção da fase aquosa e do fenol, por

precipitação sequencial em etanol (Merck), de acordo com procedimento previamente descrito (CHOMCZYNSKI, 1993).

Considerando que o Trizol rompe as células e mantém a integridade do RNA, as células foram lisadas e estocadas a -80°C , até o momento do uso. Em todas as amostras, foi utilizado 1 mL de Trizol a cada 5 mL de sangue. Todas as etapas seguiram as recomendações do fabricante. O DNA foi suspenso em TE (10 mg/mL) (Sigma) e o RNA em solução aquosa com adição de dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma), e mantido à -80°C .

A quantificação e pureza das extrações foram obtidas por meio da avaliação das absorvâncias e cálculo das razões, usando um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington, DE). Amostras consideradas sem contaminação protéica possuem razão 260/280 entre 1.8-2.2 e ausência de contaminação por fenol na razão 260/220 entre 1.8-2.0. Só foram utilizadas amostras com razões dentro dessa faixa de qualidade.

A integridade da molécula de RNA foi avaliada por eletroforese microfluida em nanochips, usando o *kit RNA nano 6000* em aparelho Bioanalisador 2100 (Agilent Technologies). Após a eletroforese, é fornecido um valor de integridade (*RNA integrity number* - RIN) que varia em uma escala de 0-10, conforme a razão entre o fragmento 28S/18S. Segundo recomendações da Agilent, em geral, amostras com RIN abaixo de 7,0 devem ser descartadas. No presente trabalho foram somente utilizadas amostras que exibiram valor de integridade $\geq 9,0$. Os parâmetros da corrida e o gel virtual de todas as amostras utilizadas encontram-se em anexo (ANEXO F). Todas as etapas de extração de ácidos nucleicos e controle de qualidade do RNA foram realizados no laboratório de Imunogenética Molecular, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

5.4. Genotipagem HLA de classe II dos pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1

A genotipagem HLA de classe II (*HLA-DQB1*) dos pacientes com DM1 foi feita utilizando-se do kit *LABType® PCR-SSO®* (*polymerase chain reaction - specific sequence of oligonucleotides*), com tecnologia Luminex (One Lambda Inc., Canoga Park, CA), realizado no laboratório de HLA do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

O princípio do procedimento inclui uma amplificação com *primers* biotinilados a partir de 20 ng de DNA. O material amplificado passa por um processo de desnaturação e posterior hibridação com sondas ligadas a microesferas (*beads* do sistema multianalítico Luminex), com sondas específicas, no caso, os alelos *HLA-DQA1/HLA-DQB1* (CESBRON-GAUTIER *et al.*, 2004). Após a etapa de hibridização, as sondas foram marcadas com uma solução *Streptavidin - Phycoerytherin* (SAPE) e lidas em aparelho *LABScan 100* (One Lambda, Canoga Park, CA). Os dados gerados foram analisados no software *HLA fusion 2.0* (One Lambda).

5.5. Reação de hibridação com *oligo-microarrays*

Para a avaliação do transcriptoma total de todos os pacientes (aproximadamente 41 mil transcritos), foram utilizadas lâminas de microarrays *human genome 4x44K oligo microarrays* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) em metodologia monocolor com o kit (*Cy3*) *Quick Amp labeling* (Agilent Technologies), seguindo todas as recomendações do fabricante (“G4140-90040_GeneExpression_One-color_v6.5.pdf (objeto application/pdf)”, [S.d.]). Todas as etapas do procedimento de *microarrays* foram realizadas no Laboratório de

Imunogenética Molecular no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

As condições bioquímicas do processo são conforme esquematizadas na Figura 6. A partir de 500 ng de RNA total com adição de RNA controle (*spike-in*) realizou-se a etapa de transcrição reversa, utilizando a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus – Reverse Transcriptase* (MMLV-RT) para a construção de cDNA dupla fita com o uso de *primers* adaptados com bases timinas consecutivas acopladas a um promotor T7 pareado na região final 5' da primeira fita dos cDNAs.

Posteriormente, a enzima *T7 RNA Polymerase* foi adicionada com nucleotídeos marcados com o fluorocromo cianina 3 (Cy3), para etapa de amplificação de RNAs complementares anti-sense (cRNA). Os cRNAs foram purificados e hibridados com as lâminas de *microarray* por 17 horas à 65°C em forno de hibridação para *microarrays* (Agilent Technologies). A hibridação de cRNA é mais estável do que a de cDNA, permitindo maior acurácia nas lavagens, com menor proporção de background (FARRELL, 2009).

Finalmente, após as etapas de lavagens com os tampões *GE Wash Buffer 1* e *GE Wash Buffer 2*, (Agilent Technologies), as imagens foram obtidas em leitura do espectro verde 550nm, em *scanner* de DNA *microarray* com tecnologia de alta resolução *Surescan* (Agilent Technologies).

Figura 6. Esquema representativo das reações de transcrição reversa, amplificação, purificação e hibridação de *microarrays* da plataforma Agilent. Adaptado de (“G4140-90040_GeneExpression_One-color_v6.5.pdf (objeto application/pdf)”, [S.d.])

Para fins de publicação com experimentos de *microarrays*, exige-se que todas as condições experimentais e de análise, assim como os dados brutos sejam depositados em bancos de dados públicos. Dessa forma, as listas completas dos dados utilizados nesse trabalho em cada forma de manifestação da doença, estão disponíveis no banco de dados público *Minimum Information About a Microarray Experiment* (MIAME) (“MIAME - Workgroups - FGED”, [S.d.]), pelos códigos de acesso: DM-1 (E-MEXP-3348), DM-2 (E-MEXP-3287) e DMG (E-MEXP-3349).

5.6. Análise dos dados

A análise dos dados foi feita preferencialmente em plataforma UNIX. As análises restringiram-se a duas linguagens de programação, R e PERL. A linguagem R (“The R Project for Statistical Computing”, [S.d.]) consiste de ambiente estatístico-matemático com inúmeros pacotes de funções múltiplas, amplamente utilizados em análises de dados de *microarrays*. Já os *scripts* em PERL (“The Perl Programming Language - www.perl.org”, [S.d.]), permitiram o processamento de ampla quantidade de dados a serem utilizados nas análises de *module maps*. Todas as etapas da análise foram conduzidas no *Laboratoire de Technologies Avancées pour le Genome et la Clinique*, junto ao *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (TAGC/INSERM-U928, *Marseille*, França) sob supervisão do Prof. Dr. Denis Puthier.

5.6.1. Quantificação e normalização dos dados

A quantificação dos dados e o controle de qualidade foram feitos usando o software *Feature Extraction*, versão 10.7 (Agilent Technologies). O software consta com o

posicionamento automático de *grids* por reconhecimento de regiões marginais, além de fornecer diversos gráficos de controle de qualidade das hibridações. Foi utilizado o protocolo *GE1_107_Sep09* para a identificação dos oligonucleotídeos na lâmina. A partir da tabela de dados quantificados, foram selecionadas a mediana dos dados brutos (*gMedianSignal*) e a mediana do background (*gBGMedianSignal*) para análises posteriores

Os dados de expressão foram posteriormente introduzidos em ambiente R, versão 2.11.0. Para a inclusão dos dados, identificação das *flags* e geração das matrizes foi utilizado o pacote AgiND. Esse pacote, dedicado especificamente ao processamento de dados Agilent, foi desenvolvido pelo grupo do Dr. Denis Puthier, podendo ser solicitado por meio do *link* (“TAGC - INSERM U928 - AgiND”, [S.d.]). Apesar do pacote também permitir o processamento de dados até a etapa da normalização, neste trabalho também foram adaptadas funções dos pacotes Affy (GAUTIER *et al.*, 2004) e MARRAY (YANG; DUDOIT, 2011).

Esta etapa inclui a retirada dos controles positivos e negativos, exclusão de genes cujos valores sobrepuseram os valores de *background*, correção do *background* (sinal – background), e conversão dos dados em escala logarítmica ($\log_2$). Alguns valores negativos gerados foram substituídos por valores positivos pequenos, selecionados randomicamente.

Finalmente, foi efetuada normalização pela metodologia *quantile*. Tal método é considerado o mais robusto, corrigindo as diferenças nas densidades de probabilidade de todas as amostras (BOLSTAD, B M *et al.*, 2003). Para a verificação dos dados após a normalização foram criados gráficos em formato *boxplots* e *MAplots*, sendo esses últimos gerados pelos valores M e A, sendo esses, $M = \text{valor normalizado} - \text{mediana}$ e $A = (\text{valor normalizado} + \text{mediana})/2$.

5.6.2. Análise de partição por *Density Based Filtering and Markov Clustering* (DBF-MCL)

O algoritmo utilizado como filtro não-informativo por densidade DBF-MCL, implementado no pacote Rtools4TB, foi criado pelo grupo do Dr. Denis Puthier com a finalidade de extrair grupos de genes corregulados a partir de dados de *microarray* (LOPEZ *et al.*, 2008). O procedimento envolve o cálculo de uma matriz baseada no *k-nearest neighbours* (DKKN) e possui três passos: encontrar elementos (genes) em áreas densas por meio de uma randomização empírica de DKKN; usar os elementos selecionados para construir um gráfico e, finalmente gerar um algoritmo de agrupamento de Markov. O processo envolve o cálculo de uma taxa de falsa descoberta (*false discovery rates* - FDR), que para a presente análise foi 10%.

5.6.3. Análise do componente principal (PCA)

A análise do componente principal (*principal components analysis* - PCA) consiste de uma técnica estatística multivariada de simplificação de conjuntos de dados complexos. Em análises de *microarrays* é utilizado com frequência com o objetivo de prever a tendência dos dados, identificando os padrões predominantes de expressão. O procedimento envolve a redução da dimensionalidade dos dados por uma análise de covariância entre os fatores, em geral, correlacionando amostras e condições. Essa análise foi utilizada para prever a tendência de separação entre os pacientes nas diferentes formas da doença de acordo com a expressão dos genes previamente identificados por análise de partição por DBF-MCL, por meio do pacote Ade4 em R (CHESSEL *et al.*, 2004).

5.6.4. Análise estatística *rank products*

Os genes diferencialmente expressos foram identificados pela análise *rank products*, usando o pacote RankProd (HONG *et al.*, 2006) na plataforma R. Embora o método não-paramétrico não assuma a distribuição de dados, tal metodologia é atualmente considerada como uma das ferramenta mais robustas para análise estatística de *microarrays*, fornecendo listas gênicas classificadas por postos. Neste trabalho, os genes foram considerados significativos com valores de $p \leq 0.001$, em concomitância com a taxa de dados falso-positivos (*false positive predictions* - PFP) ≤ 0.05 . Esse teste é aplicado de forma pareada: DM-1 *versus* DMG, DM2 *versus* DMG, e, DM1 *versus* DM2.

5.6.5. Análise integrativa do transcriptoma com dados demográficos, clínicos e laboratoriais por estatística hipergeométrica, usando a estratégia dos *module maps*

Os genes significativos e diferencialmente expressos obtidos por DBF-MCL e *rank products* foram inicialmente submetidos ao agrupamento hierárquico, com distância métrica de Pearson, utilizando o *software* Cluster 3.0 (EISEN *et al.*, 1998). O arquivo gerado, em extensão “.cdt”, pode ser usado como arquivo de entrada no *software* Genomica (SEGAL *et al.*, 2004), que permite a construção dos *module maps*.

A construção dos *module maps* também utiliza mais duas matrizes binárias (0 e 1) para o cálculo. Foram utilizados comandos em linguagem PERL para a geração dessas matrizes. No presente trabalho, o *array set* corresponde às características demográficas, clínicas, laboratoriais e terapêuticas dos paciente (Figura 5), ao passo que o arquivo *gene set* contém genes classificados por categoria de anotação e será descrito com mais detalhes posteriormente.

Inicialmente, o algoritmo Genomica realiza filtragem, selecionando apenas genes que foram induzidos ou reprimidos com variação de expressão (*fold change*) ≥ 1.0 . Posteriormente, os dados são submetidos à análise estatística hipergeométrica por teste de *Fisher* modificado, com correção pela taxa de falsa descoberta ($p \leq 0.05$, $FDR \leq 0.05$), objetivando comparar duas categorias: genes modulados (filtrados) que fazem parte de uma anotação gênica prévia (*gene set*) com dados que os caracterizam (*array sets*). Com essa estratégia é possível gerar grupos de genes compartimentalizados, organizados em módulos (*module maps*), que discriminam padrões gênicos de variáveis de acordo com o padrão do paciente, ou seja, a comparação (estatística hipergeométrica) de *gene sets* com *array sets* em etapas, conforme descrito na Figura 7.

Figura 7. Pipeline representativo da análise integrativa dos perfis transcricionais com variáveis demográficas, clínicas, laboratoriais e terapêuticas, usando a estratégia de *module maps*. Em A) Genes filtrados por *fold change* são selecionados quanto à sua representatividade nos *gene sets*; B) Genes identificados nas categorias fornecidas do *gene set* são separados em módulos de expressão; C) Os módulos são re-agrupados; D) Os módulos significativos são finalmente comparados com os *array sets*, gerando os *heatmaps* finais. Adaptado de (SEGAL *et al.*, 2004).

Além da filtragem por *fold change*, outros parâmetros também foram utilizados nas diferentes etapas da construção dos *module maps*, conforme descrito na Figura 8.

Figura 8. Parâmetros utilizados na análise de *module maps*.

5.6.5.1. Variáveis do tipo *array set*

As variáveis usadas para criar os *arrays sets* incluem dados demográficos (idade e sexo), clínicos (tempo de doença, obesidade, tempo e número de gestações), dados laboratoriais (glicose sérica e níveis de hemoglobina glicada) e padrões de tratamento (uso de hipoglicemiantes, como insulina, metformina e outras drogas). As variáveis foram assinaladas por valores binários, conforme descrito anteriormente e representado na Figura 5.

5.6.5.2. Variáveis do tipo gene set

Esta etapa corresponde à anotação gênica prévia, na qual os genes são separados por categorias de interesse na forma de matrizes binárias para compor os arquivos utilizados para a construção dos *module maps*. Considerando que cada tipo de diabetes possui atuação de diferentes tipos celulares na sua etiologia, essas células podem acarretar diferenças de expressão gênica entre os tipos. Assim, conjuntos de perfis de expressão de células do sistema imune foram utilizados para comparação com os dados deste estudo. Além disso, dados disponíveis em bancos de dados sobre o diabetes por GWAS, bem como listas gênicas obtidas por meta-análises do diabetes e complicações diabéticas também foram consideradas neste trabalho.

Conjuntos gênicos específicos de células imunológicas foram obtidos por re-análise de dados de *microarrays* oriundos do *Immunological Project* (ImmGen) (“Immunological Genome Project (ImmGen)”, [S.d.]). O *ImmGen* é um projeto que integra onze centros de pesquisa para obtenção de todos os tipos celulares de linhagens linfoides e mieloides por separação magnética em diferentes estágios de diferenciação, maturação, ativação, estágios efetores, localização tecidual e variações genéticas (HENG; PAINTER, 2008). O *ImmGen* é considerado, atualmente, como o maior projeto de imunologia do mundo, integrando os centros que dominam as técnicas de separação celulares mais rigorosas, com duas etapas de citometria de fluxo consecutivas para assegurar a pureza das amostras. No presente trabalho foi analisado um compêndio de dados de *microarrays Affymetrix Gene 1.0ST array* de células imunes murinas, gentilmente cedidos pelos integrantes do projeto, respeitando todos os critérios de política de privacidade. Foram cedidas 66 hibridações (dados brutos) de *microarrays* de 12 tipos celulares do sistema imune:

➤ Macrófagos;

- Linfócito B1a;
- Linfócito B1b;
- Linfócito B foliculares (LB-Fo);
- Linfócito B da zona marginal (LB-ZM);
- Linfócito T CD4+ naïve;
- Linfócito T CD4+ de memória;
- Linfócito T CD8+ naïve;
- Linfócito T CD8+ de memória;
- Célula dendrítica;
- Linfócito iNKT;
- Célula T regulatória (Treg).

Para a obtenção das assinaturas das células imunes foi, inicialmente, realizada normalização (razão) pela mediana de todos os dados, seguida de um corte por *fold change* ≥ 2 . Para a obtenção de assinaturas humanas, os genes foram submetidos ao banco de dados Homologene, para a busca de genes ortólogos (“HomoloGene Home”, [S.d.]) e a correspondência dos mesmos com assinaturas humanas pelo TranscriptomeBrowser (“TranscriptomeBrowser: data mining of public microarray data.”, [S.d.]).

Conjuntos gênicos relacionados à doença foram obtidos a partir de bancos de dados públicos da enciclopédia *Human Genome Epidemiology* (HuGE) *Navigator*, o *GWAS integrator* (“HuGENavigator|GWAS Integrator|Search”, [S.d.]) e o *Phenopedia* (“HuGENavigator|PhenoPedia|Search”, [S.d.]).

O *GWAS integrator* é uma compilação de genes fornecidos e filtrados a partir do catálogo GWAS, bem como os bancos originais HapMap, SNAP e Hugenavigator (YU *et al.*, 2011). Até o momento, estão disponíveis dados apenas do DM1 e DM2, que foram consideradas para esse estudo.

O Phenopedia é um banco de dados de estudos de associação genética e meta-análises. As listas gênicas são fornecidas pelas categorias de doenças específicas e complicações relacionadas (YU *et al.*, 2010). As listas relacionadas com o *diabetes mellitus*, são:

- *Status* pré-diabético;
- Diabetes;
- DM1;
- DM2;
- DMG;
- Complicações diabéticas;
- Obesidade;
- Angiopatia;
- Cetoacidose;
- Nefropatia;
- Neuropatia;
- Retinopatia.

Todos os genes utilizados neste trabalho para construção dos *gene sets*, oriundos do *ImmGen*, *GWAS integrator* e Phenopedia, estão disponibilizados em anexo (ANEXO H).

5.6.6. Análise de enriquecimento funcional

Todos os agrupamentos de genes corregulados foram submetidos à análise funcional, usando o banco de dados DAVID (do inglês, *Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*), versão 6.7. Esse método foi utilizado para identificar processos biológicos e vias representadas por genes diferencialmente expressos, integrando dados de diversos bancos para a realização de um enriquecimento funcional (HUANG *et al.*, 2007). Uma categoria foi considerada significativa caso tivesse no mínimo três genes e um *score* ≤ 0.05 com correção de Benjamini-Hochberg. Além disso, foram selecionadas somente categorias dos bancos internos *Gene Ontology* (GO), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) e *Biocarta*, a partir dessa análise (“DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis”, [S.d.]).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Controle de qualidade das amostras, genotipagem, hibridações e normalização dos *microarrays*

Todas as amostras de RNA e DNA apresentaram razão 260/280 entre 1.8 e 2.2, razão 260/220 entre 1.8 e 2.0. Todas as amostras de RNA apresentaram integridade comprovada pela eletroforese microfluida, analisa por nanochips em aparelho Bioanalisador (Agilent Technologies) O gráfico resultante da corrida, o gel virtual e os valores RIN de todas as amostras dos pacientes encontram-se em Anexo (ANEXO F). O valor do RIN deve ser acima de 7,0. No presente trabalho, a média dos RINs de todas as amostras foi de $9,4 \pm 4$.

Quanto ao resultado da genotipagem, a maioria dos pacientes com DM1 possui alelos de susceptibilidade (*HLA-DQA1*0301-BI*0302* e *HLA-DQA1*0501-BI*0201*) à doença (Tabela 3).

Tabela 3. Genotipagem *HLA-DQA1/HLA-DQB1* de pacientes com DM1.

Paciente	Genótipo <i>HLA-DQA1/HLA-DQB1</i>
DM1_1	01: 02; 03:01*/03:02; 0602*
DM1_2	03:01 ; 05:05*/03:01; 0302*
DM1_3	01:01; 03:01*/03:02; 05:01*
DM1_4	01:01; 05:01*/02:01; 05:01*
DM1_5	01:01; 02:01*/ 02:02; 0501*
DM1_6	01:02; 05:05*/03:01; 05:01*
DM1_7	05:05; 05:05*/03:01; 03:01*
DM1_8	03: 01; 05:01*/02:01; 05:01*
DM1_9	02:01; 03:01*/03:01; 05:01**
DM1_10	01:01; 01:02*/05:01; 06:05*
DM1_11	01:02; 03:01*/03:02;06:04*
DM1_12	03:01; 05:01*/02:01; 03:02*
DM1_13	01:01; 02:01*/05:01; 05:01*
DM1_14	01:01; 03:01*/03:02; 05:01*
DM1_15	01:01; 02:01*/03:03; 05:01*
DM1_16	03:01; 03:01*/03:01; 03:02*
DM1_17	04:01; 05:05*/03:01; 04:02*
DM1_18	01:02; 05:05*/03:01; 06:02*
DM1_19	01:01; 05:05*/03:01; 05:01*

A quantificação e controle de qualidade da reação de hibridação por *microarrays* são avaliados pelo software Feature Extraction (Agilent Technologies). Um exemplo típico do arquivo gerado encontra-se no em anexo (ANEXO G). Todas as quantificações foram feitas na mesma época, com kits do mesmo lote, e seguiram, basicamente, o mesmo padrão de qualidade. A quantificação é realizada após o posicionamento automático das *grids*. Todas as *grids* foram reconhecidas como normais. O controle de qualidade das hibridações é avaliado pela concentração e sinal de fluorescência logarítmica dos controles positivos, *spike-in*, o qual é representado pela equação da reta. A porcentagem (%) do coeficiente de variação (CV) representa o cálculo de intensidade da fluorescência que ficaram com os valores de mediana dentro dos parâmetros de especificações da Agilent. Os *outliers*, pontos enquadrados fora da análise decorrente da normalização do canal de fluorescência, devem apresentar um valor inferior a 0,50%, e, conforme mostrado, esse valor para nossos dados ficou em cerca de 0,05%. Mesmo com baixo valor de *background* e *outliers*, os valores de expressão que se sobreponham com o valor de background foram retirados da análise, segundo ilustrado na Figura 9.

Figura 9. Distribuição das frequências dos dados contra os valores de expressão em escala logarítmica em uma lâmina de microarray *Agilent*. Encontram-se destacados os valores de *background* e o valor de corte utilizado para filtragem.

A normalização foi feita entre todos os pacientes utilizados, pelo método *quantile* para o ajuste das distribuições de probabilidade. A Figura 10 mostra que os *microarrays* de todas as lâminas de todos os pacientes diabéticos utilizados, representados pelos boxes (gráficos *box plots*), possuem posições e comprimentos similares.

Figura 10. Gráficos *boxplot* de todos os dados de *microarrays* utilizados neste trabalho, após a normalização pela metodologia *quantile*.

Após a etapa de filtragem e normalização, para confirmação da qualidade da intensidade do sinal, foram feitos gráficos em formato *MA plot*. Esse gráfico é calculado pela razão entre a intensidade de sinal de cada *microarray* (representado no eixo x) e a intensidade de sinal gerada pela mediana dos sinais de todos os *microarrays* (representado no eixo y). Os valores referentes às intensidades de sinal, estão concentradas no ponto 0, com poucos valores ultrapassando os eixos limítrofes, indicando boa qualidade na intensidade de sinal dos *microarrays* hibridados, e ainda, um processo efetivo de normalização dos dados.

Figura 11. Gráficos *MA plots* de todos os *microarrays* utilizados neste trabalho. Encontram-se representadas a razão da intensidade de sinal de cada *microarray* na abscissa e a intensidade de sinal gerada pela mediana dos sinais de todos os *microarrays* na ordenada.

6.2. Categorização de genes obtidos a partir da filtragem não-informativa

A Figura 12 mostra o *heatmap* típico resultante da análise de partição, que proporciona uma visão global dos dados de todos os pacientes dos três tipos da doença. O filtro aplicado, com $FDR \leq 10\%$, apontou 8469 genes considerados informativos, divididos em 19 agrupamentos de coexpressão.

Além do agrupamento hierárquico das amostras, foi também analisada a dispersão espontânea dos dados filtrados por DBF-MCL, na qual os dados de expressão dos genes apontados foram submetidos à análise de covariância por PCA, que mostrou um agrupamento conjunto entre pacientes de DM1 e DMG (Figura 13), de forma similar ao agrupamento por Pearson. Para entender o fator determinante desse padrão, foi avaliada a influência de cada um dos 19 agrupamentos por PCA, em várias combinações. O único agrupamento que exibiu forte influência nas assinaturas de hibridação dos pacientes, separando melhor os tipos de diabetes, foi o agrupamento #12 (Figura 13).

Figura 12. Agrupamento hierárquico da correlação de Pearson dos 19 agrupamentos de genes coregulados identificados pela análise de partição DBF-MCL. Encontra-se em destaque o agrupamento 12

Figura 13. Gráfico da análise do componente principal (*Principal component analysis-PCA*) mostrando a disposição espacial dos pacientes com DM-1 (amarelo), DM-2 (verde) e DMG (vermelho). Nesta análise foram considerados todos os genes identificados pelo filtro não-informativo DBF-MCL.

Figura 14. Gráfico da análise do componente principal (*Principal component analysis-PCA*) mostrando a disposição espacial dos pacientes com DM-1 (amarelo), DM-2 (verde) e DMG (vermelho). Nesta análise foram considerados genes identificados pelo filtro não informativo DBF-MCL, com exceção dos genes pertencentes ao agrupamento 12.

Finalmente, cada agrupamento foi submetido à análise de enriquecimento funcional, conforme esquematizado na Figura 15.

Figura 15. *Heatmap* ilustrativo das categorias significativas por agrupamentos gênicos identificados por DBF-MCL. Foram dispostas categorias significativas do *Gene Ontology* e das vias *Kegg* e *BioCarta*, identificados pela análise de enriquecimento funcional DAVID.

Entre os agrupamentos com categorias relacionadas ao diabetes é possível identificar o agrupamento #1 (2,569 genes), no qual os pacientes de DM-2 exibiram um grupo de genes induzidos, em sua maioria, codificando proteínas da classe *zinc finger*, enquanto esses genes foram reprimidos em DM-1 e DMG. Já no agrupamento #12 (111 genes), todos os pacientes com DM-2 exibiram um grupo de genes reprimidos. A maioria dos genes presentes no agrupamento 12 foram associados com a resposta inflamatória, incluindo atividade de citocina e quimiocina, receptores da via *NOD-like*, regulação da apoptose, regulação do processo biossintético do óxido nítrico, regulação da produção de IL-6, regulação de NFκB e regulação da cascata MAPKKK.

6.3. Categorização de genes diferencialmente expressos obtidos a partir das análises estatísticas pareadas

Os dados de *microarrays* foram submetidos à análise estatística robusta para identificação de genes diferencialmente expressos por *rank products*. As análises pareadas (DM1 *versus* DMG; DM2 *versus* DMG e DM1 *versus* DM2) forneceram genes diferencialmente expressos de alta significância ($p \leq 0,001$; FPF $\leq 0,05$) e o número de genes identificados por análise está representado pelo diagrama de Venn (Figura 16), resultando em 472 genes diferencialmente expressos em DM1, 1.128 genes em DM2, 502 genes em DMG, e 228 genes compartilhados entre os três grupos. As categorias funcionais desses genes por análise são mostradas na Figura 17.

Figura 16. Diagrama de Venn contendo os números de genes específicos e compartilhados entre análises estatísticas por *rank products*. Em A) DM1 *versus* DMG; B) DM2 *versus* DMG; C) DM1 *versus* DM2. Nas intersecções são ressaltados os números de genes específicos em cada tipo de diabetes.

Figura 17. *Heatmap* ilustrativo das categorias significativas por análise de *rank products*. Foram dispostas categorias significativas do *Gene Ontology* e das vias *Kegg* e *Biocarta*, identificados pela análise de enriquecimento funcional *DAVID*.

A partir das categorias funcionais identificadas das análises de *rank products*, foram selecionadas àquelas relacionadas com o sistema imune que, em geral, se repetem entre as análises, porém, com genes específicos em cada tipo de diabetes (Tabela III).

Tabela 4. Funções de genes relacionados ao sistema imune, identificados pela análise estatística *rank products*.

Forma de manifestação da doença	Em relação a	Processo biológico	Genes
DM1	DMG	Genes da região do MHC	<i>HLA-DQA1 e HLA-DQA2</i>
		Receptores da família TNF	<i>TNFRSF17, TNFAIP6</i>
		Citocinas	<i>IL1A, IL-1B, IL1F10, IL4, IL6, IL8, IL23A, IL27</i>
		Receptores de citocinas	<i>IL1R2, IL1R1N, IL18R1</i>
		Quimiocinas	<i>CXCL1, CXCL2, CCL20, CCL23, CCL3L3, CCL4</i>
		Receptores de quimiocinas	<i>CCR3, CCR2</i>
		Receptores de linfócitos	<i>KIR3DL2, KIR2DS4</i>
		Fatores de transcrição	<i>GLIS2, SOX8, GATA2, RUNX1, SOD2, FOXC1, FOXC2, FOXE1</i>
	DM2	Região do MHC	<i>HLA-DQA1 and DQA2, HLA-DQB1</i>
		Receptores toll-like	<i>TLR5, TLR6, TLR7, TLR10, CARD9</i>
		Grupos de diferenciação	<i>CD164, CD180</i>
		Citocinas	<i>IL2, IL7, IFNG</i>
		Receptores de citocinas	<i>TNFSF14, TNFAIP1, TNFAIP8L2, TNFSF10</i>
		Quimiocinas	<i>CCL15</i>
		Receptores de quimiocinas	<i>CCR8, CCR2</i>
		Fatores de transcrição	<i>FOXJ1</i>
DMG	DM1	Receptores toll-like	<i>TLR6, TLR7</i>
		Moléculas de ligação a carboidratos	<i>LGALS3, LGALS12, CLEC7A, CLEC1B</i>
		Receptores de membrana	<i>IL5RA, CCR1</i>
		Região do MHC	<i>HLA-DRB3</i>
		Genes da família de carreadores solúveis	<i>SLC6A10P, SLC6A4, SLC1A5, SLC4A1, SLC8A1, SLC6A17, SLC16A3, SLC6A8, SLC14A1</i>
		Grupos de diferenciação	<i>CD9, CD33, CD36</i>
		Quimiocinas	<i>CXCL5, CCL15, CXCL12, CXCL10</i>
		Resposta de defesa	<i>CXCL10, CXCR4, CD46, CCL3L3, IL1B, IL1A, NFKBIZ, IL27, C1QA, CD83, C1QB, HIF1A, DEFA4, DEFA3,</i>

DM2	DM1	DMG		<i>KIR2DL4, CXCL1, CCL3, TNF, CCR1, CXCL3, CXCL2, CCL4, CCL23, CCL20, IL6, CR2, IL8, IL1RN</i> <i>STAT3, CD55</i>
			Resposta a estímulo hormonal	<i>PTGS2, LDLR, PGF, PDGFA, PTGS1, NOS3, ADAM9, EGR2, SOCS2, SOCS3, RXRA, ADIPOR1, GAL, JUNB, C1QB, RETN, ADM, SORT1, CAV2, CAV1, TNF, GRB2, ERBB3, GNG11, BCL2L1, PIK3R1, IL6, IL1RN, STAT1, STAT3, CDKN1A, BMP7, IGFBP2</i>
			Genes relacionados à transcrição	<i>RARA</i>
			Proteínas <i>zinc fingers</i>	<i>ZNF575, ZNF101</i>
			Regulação da transcrição	<i>MYOD1, EGR1, EGR2, LEF1, HES1, OSM, HIF1A, PIAS2, TCF7L2, SEC14L2, MAML2, NR4A2, NR4A1, ILF3, NEUROG3, NR4A3, ETS1, ETS2, BMP6</i>
				<i>ZNF582, ZNF250, ZNF184, ZNF181, ZNF775, ZNF773, ZNF248, ZNF397, ZNF578, ZNF442, ZNF443</i>
			Proteínas <i>zinc finger</i>	<i>FOXO3A</i>
			Fatores de transcrição	

6.4. Módulos significativos a partir da comparação do transcriptoma com dados demográficos, clínicos, laboratoriais e de tratamento

A fim de identificar a influência de características demográficas, clínicas, laboratoriais e terapêuticas (*array sets*) em relação com a informação genética (*gene sets*), foram construídos vários *module maps*. Para a construção dos *gene sets* foi utilizado um conjunto de dados de células imunes isoladas (*Immgen*), cuja identificação das amostras e o número de genes identificados após as análises encontram-se na Tabela IV. As categorias e número de genes, usando bancos de dados de GWAS (*GWAS integrator*), e o banco de dados

associado ao diabetes e complicações diabéticas (Phenopedia), encontra-se na Tabela V. Todos os símbolos dos genes por categorias identificados nessas análises encontram-se em anexo (ANEXO H).

Tabela 5. Compilação das análises realizadas nos dados de *microarrays* dos 12 tipos celulares, obtidos pela banco de dados *ImmGen*. As assinaturas geradas foram usadas na construção dos *gene sets* e dos *module maps*.

ImmGen. As assinaturas geradas foram usadas na construção dos gene sets e dos module maps.			
Amostra	Identificação (ImmGen)	Marcadores	No de genes Threshold = 2
B1a.Sp.1	B-1a (baço)	CD19+B220+IgM++AA4-CD23-CD43+CD5+	176
B1a.Sp.2			181
B1a.Sp.3			192
Total B1a.Sp			163
B1a.PC.1	B-1a (cavidade peritoneal)	CD19+B220+IgM++AA4-CD23-CD43+CD5+	206
B1a.PC.2			207
B1a.PC.3			202
Total B1a.PC			178
Total de genes da assinatura			125
B1b.PC.1	B-1b (cavidade peritoneal)	CD19+B220+IgM++AA4-CD23-CD43+CD5-	188
B1b.PC.2			199
B1b.PC.3			200
Total de genes da assinatura			173
B.Fo.Sp.1	B_Fo (Foliculares)	CD19+B220+IgM+AA4-CD23+CD43-CD5-	163
B.Fo.Sp.2			156
B.Fo.Sp.3			156
Total de genes da assinatura			140
B.MZ.Sp.1	B_MZ (Zona marginal)	CD19+B220+IgM++AA4-CD23-CD21/35++	189
B.MZ.Sp.2			194
B.MZ.Sp.3			194
Total de genes da assinatura			176
T.4Mem.Sp.1	LT CD4+ memória	CD4+CD8- TCR+ CD44hi CD62Lo	104
T.4Mem.Sp.4			103

T.4Mem.Sp.5	(baço)	106
T.4Mem.Sp		86
T.4Mem.LN.1		71
T.4Mem.LN.2	LT CD4+ memória	85
T.4Mem.LN.3	(linfonodo subcutâneo)	72
T.4Mem.LN		58
Total de genes da assinatura		48
T.4Nve.Sp.1		69
T.4Nve.Sp.2	CD4 naive (baço)	60
T.4Nve.Sp		52
T.4Nve.MLN.1		63
T.4Nve.MLN.2	CD4 naive (linfonodo	61
T.4Nve.MLN.3	mesentérico)	53
T.4Nve.MLN		51
	CD4+ CD8- TCR+ 25- 62Lhi 44lo	
T.4Nve.LN.1		70
T.4Nve.LN.2	CD4 naive (linfonodo	62
T.4Nve.LN.3	subcutâneo)	63
T.4Nve.LN		51
T.4Nve.PP.1		64
T.4Nve.PP.2	CD4 naive (placas de peyer)	55
T.4Nve.PP		51
Total de genes da assinatura		42
T.8Mem.Sp.1		80
T.8Mem.Sp.3	CD8 memória	78
T.8Mem.Sp.4	(baço)	82
T.8Mem.Sp		69
	CD4- CD8+ TCR+ CD25- CD44hi CD122hi	
T.8Mem.LN.1		61
T.8Mem.LN.2	CD8 memória (linfonodo	62
T.8Mem.LN.3	subcutâneo)	63
T.8Mem.LN		52

Total de genes da assinatura		51
T.8Nve.Sp.1		64
T.8Nve.Sp.2	CD8 naive	64
T.8Nve.Sp.3	(baço)	68
T.8Nve.Sp		54
T.8Nve.MLN.1		69
T.8Nve.MLN.3	CD8 naive	77
T.8Nve.MLN.4	(linfonodo mesenterico)	67
T.8Nve.MLN		61
T.8Nve.LN.1		64
T.8Nve.LN.2	CD8 naive	74
T.8Nve.LN.3	(linfonodo subcutâneo)	65
T.8Nve.LN		56
T.8Nve.PP.2	CD8 naive (placas de peyer)	65
Total de genes da assinatura		46
DC.103.11b..Lv.1		336
DC.103.11b..Lv.2		330
DC.103.11b..Lv.1.1	Células Dendriticas	441
DC.103.11b..Lv.2.1	(fígado)	471
DC.103.11b..Lv.3		622
DC.103.11b..Lv		161
DC.103.11b..Lu.1		422
DC.103.11b..Lu.2	Células Dendriticas	407
DC.103.11b..Lu.3	(pulmão)	440
DC.103.11b..Lu		356
Total de genes da assinatura		122
NKT.44.NK1.1..Th.1	Precursor	126
NKT.44.NK1.1..Th.1.1	iNKT CD44+	126
NKT.44.NK1.1..Th.1.2	NK1.1+	86

NKT.44.NK1.1..Th.2		119
NKT.44.NK1.1..Th.2.1		131
NKT.44.NK1.1..Th.2.2		116
NKT.44.NK1.1..Th.3		154
NKT.44.NK1.1..Th.4		140
Total de genes da assinatura		41
T.4FP3.25..Sp.2	Tregs CD25+ Foxp3+	89
T.4FP3.25..Sp.3	(baço) CD4+ CD8- TCR+ GFP+ CD25+	91
Total de genes da assinatura		78
MF.Lu.1		550
MF.Lu.2	Macrófago CD45+ CD11c+ CD8- CD11b- CD103- SiglecF+	558
MF.Lu.3		556
Total de genes da assinatura		497

Tabela 6 Compilação do número de genes identificados em dois bancos de dados (*GWAS integrator* e *Phenopedia*). As assinaturas geradas foram usadas como *gene sets* na construção dos *module maps*.

Ferramenta	Categoria	Número de genes
GWAS integrator	GWAS_DM-1	78
	GWAS_DM-2	128
Phenopedia	DM-1	491
	DM-2	2936
	DMG	56
	Diabetes	3278
	Pré-diabetes	29
	Angiopatia	132
	Cetoacidose	17
	Complicações	590
	Nefropatia	210
	Neuropatia	57

	Obesidade	1127
	Retinopatia	105

Após a primeira etapa da construção dos *module maps*, os genes previamente identificados por análise estatística, são filtrados por *fold change*, por número mínimo de genes e dispostos segundo as categorias significativas do *gene set*. A Figura 18 mostra a assinatura gênica de macrófagos a partir de genes identificados por *rank products* (DM1 *versus* DMG).

Figura 18. *Heatmap* contendo assinatura gênica típica de macrófagos. Os genes diferencialmente expressos representados foram identificados a partir da análise *rank products* DM1 *versus* DMG. Em vermelho estão destacados genes previamente associados ao diabetes.

Em geral, na análise DM1 *versus* DMG, a assinatura de macrófagos foi a mais significativa, na qual grande parte dos genes (induzido em DMG) foi também associado ao diabetes, em especial, genes associados ao DM2. Alguns genes também foram identificados em algumas complicações em geral, assim como em obesidade. Os genes *IL1A*, *IL1B* e *LGALS3* também são compartilhados com células dendríticas (ambos células apresentadoras de antígenos). Já os genes *CD36*, *CYBB*, *TLR7*, *CCR1* e *NLRC4* também são compartilhados com alguns tipos de linfócitos B *naive* (Figura 18).

A Figura 19 mostra a assinatura gênica de células dendríticas a partir de genes identificados por *rank products* (DM1 versus DM2).

Figura 19. *Heatmap* contendo assinatura gênica típica de células dendríticas. Os genes diferencialmente expressos foram identificados a partir da análise *rank products* DM1 versus DM2. Em vermelho estão destacados genes previamente associados ao diabetes.

Os genes identificados em células dendríticas também foram descritos, em sua maioria em diabetes e DM2. Os genes *HLA-DQA1* foi descrito na maioria das complicações (retinopatia, obesidade, neuropatia e nefropatia). Já os genes *IL1A*, *IL1B* e *RGS1* foram também associados ao DM1, sendo que o gene *RGS1* também foi identificado em Tregs (Figura 19).

A Figura 20 mostra a assinatura gênica de diabetes a partir de genes identificados por *rank products* (DM2 versus DMG).

Figura 20. *Heatmap* contendo assinatura gênica típica de genes associados à obesidade. Os genes diferencialmente expressos foram identificados a partir da análise *rank products* DM2 versus DMG. Em vermelho estão destacados genes previamente associados ao diabetes.

Essa análise não apresentou prevalência de tipo celular específico, e sim genes associados com o diabetes e inúmeras complicações. Os genes codificadores de *IL8*, *IL1A*, *IL1B*, *TNF*, *EGR2* e *SOD2* foram induzidos em DMG. Esses genes foram previamente associados ao diabetes e também à obesidade (Figura 20).

Finalmente, os *heatmaps* resultantes da análise de *module map* propriamente ditas estão dispostos na Figura 21. Foram incluídos *module maps* de genes oriundos da análise de partição por DBF-MCL (Figura 21-A), e *rank products* DM1 versus DMG (Figura 21-B); DM2 versus DMG (Figura 21-C); DM1 versus DM2 (Figura 21-D).

Figura 21. *Heatmaps* representativos dos *module maps* contendo genes previamente identificados a partir das análises: A) DBF-MCL; B) *Rank products* DM1 versus. DMG; C) *Rank products* DM2 versus DMG; C) *Rank products* DM1 versus. DM2.

Considerando as análises de *module maps*, o DMG exibiu genes induzidos, observados em complicações diabéticas (incluindo angiopatia) e macrófagos. As categorias obesidade, número de gestação e tempo de gestação foram também associadas com a indução de complicações diabéticas, sendo também associado com perfis de expressão de macrófagos. Além disso, a ocorrência de 2 ou mais gestações foi associada positivamente com os genes de DM2 (Phenopedia). Os pacientes de DM1 exibiram genes induzidos típicos dos expressos por células dendríticas e genes reprimidos típicos de linfócitos B. Em adição, o DM1 exibiu indução de genes relacionados com a nefropatia diabética. O uso de insulina não influenciou os padrões de expressão dos pacientes de DM1, no entanto, os níveis de glicose sérica foram associados com a indução de genes relacionados com a retinopatia diabética. Em pacientes com DM2, a doença por si mesma ou o uso da metformina foram associados com a repressão de genes associados com a obesidade e complicações diabéticas. Em contraste, genes

polimórficos identificados por GWAS em DM2 foram associados com a indução de genes em pacientes DM2. Pacientes DM2 do sexo masculino com 11 ou mais anos de doença apresentaram genes de neuropatia. O *heatmap* mostrado na Figura 21-A ilustra esses resultados.

Nas análises pareadas de pacientes com DM1 e DMG, as características obesidade, duas ou mais gestações, foram associadas com o desenvolvimento de DM2 e com complicações diabéticas em pacientes com DMG, enquanto essas variáveis foram associadas negativamente com pacientes de DM1. Em pacientes DM1, o uso da insulina parece prevenir as complicações diabéticas (Figura 21-B). As análises pareadas de DM2 e DMG, o número de gestações foi correlacionado positivamente com genes relacionados com complicações diabéticas e expressão gênica de macrófagos. Em pacientes DM2, o uso de metformina foi associado negativamente com complicações (Figura 21-C). A análise pareada de DM1 e DM2 mostrou genes associados ao DM2 e com a obesidade em pacientes de DM1 (Figura 21-D).

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

O *diabetes mellitus* é, atualmente, considerado problema sério de saúde pública, com aumento alarmante na incidência global (“WHO | Facts and figures about diabetes”, [S.d.]). Embora o DM1 tenha sido estudado desde a década de 70 com a identificação dos genes HLA, houve aumento significativo na compreensão dos mecanismos moleculares apenas na última década (Figura 1) (POCIOT *et al.*, 2010), enquanto a genética do DM2 tem sido elucidada apenas nos últimos dez anos (Figura 2) (PROKOPENKO *et al.*, 2008), em especial por GWAS. Dos principais tipos de diabetes, a genética do DMG é a menos compreendida, em geral, por estudos que o compara com marcadores identificados no DM2 (Figura 3) (LAUENBORG *et al.*, 2009). Recentemente, alguns estudos de transcriptoma têm comparado PBMCs de crianças com DM1 e DM2 (KAIZER *et al.*, 2007) e tecido placentário de grávidas acometidas de DM1, comparadas com DMG (RADAELLI *et al.*, 2009), cuja maioria dos genes diferenciais também foram identificados em assinaturas de sangue total (ZHAO *et al.*, 2011). No entanto, não existe atualmente nenhum estudo que compara os três principais tipos de diabetes em termos de expressão gênica, para o entendimento do diabetes como um todo.

Baseado nesses estudos anteriores (KAIZER *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2011), as PBMCs foram escolhidas como as candidatas para a comparação das três principais formas no diabetes. No entanto, outras implicações devem ser consideradas, no que diz respeito à etiologia dos subgrupos de diabetes. Em DM1 existe a ativação de células apresentadoras de antígenos e efetoras do sistema imune (TODD, 2010), em DM2 a inflamação por macrófagos parece representar um papel importante (DONATH; SHOELSON, 2011). Considerando as diferenças etiológicas que caracterizam os tipos, no presente trabalho foi realizada a identificação de assinaturas gênicas de 12 tipos celulares isoladamente do sistema imune dentro dessa população celular. Em adição, a tendência dos estudos na era pós-GWAS é a

identificação das variações de expressão gênica com marcadores identificados por GWAS, em especial no DM2 (CAUCHI *et al.*, 2008). Considerando que dados de GWAS de DM1 e DM2 encontram-se disponíveis, estes devem ser considerados. Finalmente, sabe-se que o diabetes evolui para complicações micro e macrovasculares. Apesar dos critérios de exclusão e pacientes em tratamento, a expressão gênica pode ter alterações. Assim, listas gênicas provenientes de meta-análises disponíveis no banco de dados Phenopedia para os três tipos de diabetes e as nove formas de complicações diabéticas também foram consideradas. Dessa forma, foram selecionadas as categorias para compor o *gene set* (anotação gênica).

Outro ponto em questão é a diferença biológica entre a expressão gênica dos indivíduos. Uma vez que se estudam pacientes, ao invés de modelo animal isogênico, é preciso considerar as diversas influências que existem entre as pessoas. Inicialmente existe a questão da possível diferença entre idade e do sexo na manifestação em doenças metabólicas (KAUTZKY-WILLER; HANDISURYA, 2009). Além disso, complicações subclínicas e tipo de tratamento também parecem afetar a expressão gênica (SUSZTAK *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2008; MAIDA *et al.*, 2011). A principal inovação deste estudo foi a construção de *module maps* informativos que integram dados epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e terapêuticos implicados no diabetes, identificando padrões particulares e compartilhados entre DM1, DM2 e DMG. Nesse contexto, a análise integrativa dos dados é mais adequada (SEGAL *et al.*, 2004).

Inicialmente, para a identificação de genes informativos foi feita análise global por DBF-MCL para avaliação de todos os pacientes. Essa análise permitiu a seleção de genes corregulados, que é a recomendada para separação de dados de alta complexidade (LOPEZ *et al.*, 2008). O principal achado desse filtro foi a identificação de um agrupamento gênico, englobando genes envolvidos na inflamação, compartilhado por alguns pacientes com DM1 e com DMG (Figuras 12 e 13), que parece influenciar os padrões de expressão gênica global de

pacientes diabéticos (Figuras 13 a 14). Uma possível explicação para esse achado é a possibilidade de inflamação subclínica nesses pacientes. Sabe-se que esse processo pode induzir o diabetes, e já foi relatado em pacientes com DMG (BARBOUR *et al.*, 2007).

Além disso, outros mecanismos moleculares identificados no agrupamento 12 parecem estar relacionados com vias de inflamação. Entre essas, encontra-se a indução de mediadores da via de sinalização *NOD-like*, da imunidade inata, em DM1 e DMG. Um trabalho recente sugere que os receptores *NOD-like* podem ser induzidos pela hiperglicemia e produtos do estresse oxidativo, como uma possível ligação entre alterações metabólicas e a inflamação, culminando na produção do *IL1B* (TANNAHILL; O'NEILL, 2011), conforme esquematizado na Figura 22. Outros trabalhos de expressão gênica em diabetes têm relatado a indução diferencial de *IL1B* no DM1 e no DM2 (KAIZER *et al.*, 2007).

Figura 22. Esquema ilustrativo da relação entre o metabolismo e a inflamação no diabetes pela indução da via de sinalização *NOD-like*. Adaptado de (TANNAHILL; O'NEILL, 2011).

Nas categorias funcionais identificadas pelas análises do DAVID, outros genes da via de sinalização *NOD-like* estavam induzidos em alguns pacientes de DM1 e DMG, tais como o receptor *NRLP3* que é ativado pelos produtos do estresse oxidativo (Figura 22). Também fazem parte dessa via os genes *CXCL1*, *CXCL2*, *IL6*, *IL8*, *TNF*, *RIPK2*, *TNFAIP3* e *NFKB1A*, induzidos nesse processo. A indução desses genes corrobora a influência da desregulação metabólica causada pelo diabetes (como a hiperglicemia) na inflamação. Além disso, nas análises funcionais realizadas, os genes *TNF* and *IL1B* também se encontraram na categoria de regulação do processo biossintético do óxido nítrico (Figura 15). Outro gene participante desse processo, o *SOD2* (também induzido em DM1 e DMG), possui grande importância no diabetes (MIAO; ST CLAIR, 2009). Foram também identificadas quimiocinas (*CCL3*, *CCL4*), citocinas (*IL6*, *IL8*, *TNF*) e fatores de transcrição (*NFKB1A*, *MAPK8*), que também estão envolvidos nas vias de sinalização *Toll-like*, via de sinalização NFκB, regulação da apoptose, e regulação da produção de *IL6*, alguns previamente identificados no diabetes (JIN *et al.*, 2011; TANNAHILL; O'NEILL, 2011).

Existem evidências de que a via *NOD-like* também pode ser ativada em DM2. Para entender porque os genes envolvidos no processo de inflamação, *NOD-like* e estresse oxidativo estão reprimidos em DM2, foram avaliados genes diferencialmente expressos, identificados por análises pareadas de *rank products*, que possui alta significância estatística. Nessas análises, foi revelada a modulação de genes importantes associados à genética do DM2, em especial fatores de transcrição envolvidos na homeostase da glicose (*TCF7L2*) (SAVIC *et al.*, 2011), indução de NAD⁺ (*FOXO3*) (CANTÓ *et al.*, 2009) e regulação da resposta à hipóxia celular e sistêmica (*HIF1A*) (CHENG *et al.*, 2010). Todas as análises (DM2 vs DM1 e DM2 vs DMG) apresentaram inúmeros genes da família dos *zinc fingers* (Tabela 4). Outro gene modulado, *SLC30A8* codifica um fator de transcrição que ativa inúmeros genes da família *zinc fingers* (BUNT, VAN DE; GLOYN, 2010).

O gene *TCF7L2* possui polimorfismos na região intrônica de abertura de cromatina que afeta a função do mesmo, cuja função do fator de transcrição codificado está relacionada com homeostase da glicose (WELTERS; KULKARNI, 2008; GAULTON *et al.*, 2010). O gene *FOXO3A* foi também induzido em DM2. Tanto *FOXO1A* quanto *FOXO3A* são mediadores da mesma via de sinalização, AMPK, que pode ser ativada em consequência de uso de metformina em longo prazo (CANTÓ *et al.*, 2009). Achados recentes mostraram que a repressão de *FOXO1* em macrófagos bloqueia o acúmulo de lipídeos nessas células, afetando inúmeros processos, o que pode estar relacionado com a função de *FOXO3A* (SONG *et al.*, 2010). Nesse contexto, o uso de metformina nos pacientes analisados pode ter afetado a expressão desse gene.

Finalmente, o gene *HIF1A* codifica fator de transcrição que regula respostas ao estresse celular, podendo ser ativado em condições de hipóxia. Alguns polimorfismos desse gene foram recentemente descritos em doença arterial periférica (BAHADORI *et al.*, 2010). Estudos com animais após silenciamento do gene *HIF1A* em células beta exibiram intolerância à glicose, disfunção de célula beta e desenvolveram intolerância grave à glicose após dieta hipercalórica (CHENG *et al.*, 2010). Os mecanismos moleculares associados ao *HIF1A* identificados no diabetes assumem que a atividade desse gene é bloqueada em ambiente com altas concentrações de glicose, afetando a expressão de VEGF e a proliferação vascular (THANGARAJAH *et al.*, 2010).

As análises pareadas de *rank products* também permitiram melhor compreensão do perfil de transcrição de DM1 ser mais próximo de DMG, em relação ao DM2, e os pacientes de DM1 apresentaram modulação de genes da região do MHC, como *HLA-DQA1* e *HLA-DQA2* em DM1 e indução de genes *HLA-DRB3* em DMG (Tabela 4). Em contraste, poucos estudos têm identificado genes do sistema HLA em associação com o DMG. Embora o papel do HLA de classe II na patogênese do DM1 não esteja bem estabelecido, expressão diminuída

das moléculas de HLA-DQ na superfície em moléculas CD4 e CD8 em células periféricas têm sido identificadas em pacientes com DM1 recentemente diagnosticados, exibindo alelos de susceptibilidade DQB1, achado atribuído à instabilidade dessas moléculas na superfície celular (FERNANDES *et al.*, 2004). Considerando que nossos pacientes não foram recentemente diagnosticados, é interessante observar que a expressão de moléculas do MHC é ainda modulada até depois da doença ter sido instalada por um longo tempo. Por outro lado, existe a evidência de que a resposta humoral à autoantígenos, tais como IA-2, seja dirigida por genes *HLA-DQA1* até mesmo em pacientes recentemente diagnosticados. Além disso, os alelos de susceptibilidade associados ao DM1 (*DQA1**05:01, *DQB1**02:01/*DQB1**03:02) são diferentes dos descritos para o DMG.

Além dos genes do MHC, os pacientes com DM1 apresentaram indução de receptores da família *killer immunoglobulin-like* (*KIR3DL2* e *KIR2DS4*) que diferiram dos KIR de DMG (*KIR2DL4*) (Tabela 4), e não há no momento estudos de expressão gênica sobre KIRs no diabetes. Esses achados indicam que as similaridades dos perfis de transcrição de DM1 e DMG podem estar relacionadas com os padrões de inflamação geral observados em ambas condições, incluindo a modulação de genes envolvidos primariamente na resposta imune inata.

Além da indução do gene *HLA-DQA1*, identificada por *rank products* na comparação entre DM1 *versus* DM2 nas assinaturas de células dendríticas (Figura 19), outro gene induzido que merece destaque no DM1 foi o gene *RGS1*. Esse gene também foi induzido em células Tregs nas análises (*microarrays* do *ImmGen*) realizadas neste trabalho (ANEXO H). Esse gene tem sido identificado por GWAS não somente em diabetes, mas também em doença celíaca (SMYTH, D. J. *et al.*, 2008), artrite juvenil (HINKS *et al.*, 2010) e esclerose múltipla (INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS CONSSORTIUM (IMSGC), 2010). A evidência de um loco comum com doenças mediadas por células T é um

achado interessante, com poucos estudos de expressão gênica no diabetes. Achados recentes mostram que a expressão do gene *RGS1* afeta a via de sinalização dos receptores de quimiocinas e a organização de órgãos linfóides secundários (HWANG *et al.*, 2010). Níveis elevados de *RGS1* afetam a migração de linfócitos T e esse processo foi associado com inflamação intestinal grave (GIBBONS *et al.*, 2011).

Nas análises de *rank products* DM2 versus DMG, não foi possível a identificação de tipo celular específico. É possível que esse achado seja uma evidência de etiologia similar entre esses tipos de diabetes. Dentre os diversos genes induzidos em DMG, merece destaque o gene *EGR2*. Apesar de esse gene ter sido identificado em assinatura de obesidade, esse gene codifica um fator de transcrição *zinc finger* no sistema imune, sendo então, de grande relevância. Esse gene foi recentemente identificado como necessário para sobrevivência de timócitos no processo de seleção tímica (LAWSON *et al.*, 2010), desenvolvimento de células B e T (LI, S. *et al.*, 2011), e ainda, no processo de autotolerância de linfócitos T com influência na autoimunidade (ZHU *et al.*, 2008). As evidências da influência desse gene na autoimunidade são reforçadas pelos achados da expressão aumentada desse gene em células Treg (CD4+CD25-LAG3+) (OKAMURA *et al.*, 2009). Além disso, sítios polimórficos do gene *EGR2* tem sido associados com o desenvolvimento do lúpus eritematoso sistêmico (MYOUIZEN *et al.*, 2010). A identificação desse gene em uma assinatura de genes previamente identificados com a obesidade é interessante. Outra evidência do papel do gene *EGR2* na obesidade está relacionada com a coexpressão com o gene *NNAT*, responsivo à dieta hipercalórica em tecido adiposo (LI, X. *et al.*, 2010). É possível que o gene *EGR2* seja outro ponto de interação do sistema imune com o metabolismo.

Ainda no DMG, dos genes induzidos neste tipo nas análises de *rank products* DM1 versus DMG, foram identificados inúmeros genes na assinatura de macrófagos (Figura 18), merecendo destaque os genes *LGALS3*, *CD36* e *NLRC4*. O gene *LGALS3* codifica um

membro da família galectina, glicoproteínas de ligação aos carboidratos com papel na apoptose, imunidade inata, adesão celular e regulação de células T (DARROW *et al.*, 2011). É um receptor de AGEs, regulado por adiponectinas, hormônios proteicos que regulam processos metabólicos como a glicemia e o catabolismo de ácidos graxos (PRICCI *et al.*, 2000). A expressão de *LGALS3* em monócitos é correlacionada com o IMC em DM2 (WEBER *et al.*, 2009). A expressão do gene *CD36* é regulada pela sinalização *PPAR γ* , amplamente associada ao metabolismo de lipídeos em monócitos (THOMAS *et al.*, 2011). Esse gene é polimórfico e tem sido associado com o *diabetes mellitus* e com o risco aterosclerótico (BERNAL-LOPEZ *et al.*, 2011). Finalmente, o gene *NLRC4* inibe a expressão do gene *NLRP3* (descrito na via de sinalização *NOD-like*) em monócitos, afetando também os genes *IL6* e *CXCL2*, também identificados como diferencialmente expressos neste estudo (GUARDA *et al.*, 2009).

Finalmente, em estudos anteriores, reportou-se que a análise de *module maps* foi útil na identificação de padrões globais e biomarcadores no câncer que não foram evidentes em experimentos únicos de *microarrays* (HANAUER *et al.*, 2007). Questões permaneceram a partir dessa análise, no que diz respeito ao uso de grande quantidade de hibridações feitas em plataformas diferentes, no qual métodos de normalização são questionáveis. Apesar de um grupo amostral relativamente pequeno, no presente trabalho foram utilizadas as mesmas condições experimentais e a mesma plataforma de *microarray* e, dessa forma, foram encontrados achados interessantes. Os principais resultados reportam a influência celular na etiologia de cada tipo de doença, identificação da variação na expressão de genes previamente identificados por GWAS e a influência de fatores demográficos, clínicos, laboratoriais e terapêuticos na expressão gênica desses pacientes.

Em relação ao grupo de pacientes DMG, em todos os *module maps* no qual os perfis de DMG são comparados com outros tipos de diabetes, nós observamos a indução de genes

tipicamente expressos por macrófagos. Além disso, esses genes de macrófagos foram corregulados com aqueles que aparecem em complicações diabéticas, em particular, angiopatia e retinopatia, como visto na Figura 21, o que inclui o gene *IL1B*. Uma vez que nós também observamos que níveis aumentados de glicose foram associados com o desenvolvimento de retinopatia, é possível que níveis de glicose atuem em macrófagos o que pode estar relacionado com complicações de DMG. No entanto, pacientes com DMG exibiram perfis gênicos similares aqueles previamente identificados na obesidade (dados do Phenopedia), e a maioria dos pacientes do nosso estudo apresentavam sobrepeso. É também interessante observar que a obesidade, duas ou mais gestações, e período gestacional superior a 30 semanas exibiram os mesmos módulos de genes induzidos, como observado na Figura 21-B. Em adição, em pacientes com DMG, a presença de duas ou mais gestações foi positivamente associados com o desenvolvimento de DM2 (Figura 21-B), o que é condizente com a literatura. Essa informação é importante para estudos futuros de acompanhamento de pacientes com DMG, após o parto.

Em pacientes com DM1, foi observada associação positiva entre os perfis gênicos desses pacientes com aqueles reportados para células dendríticas nos dados de células isoladas (*ImmGen*), particularmente pacientes com maior tempo de doença (Figura 21-D). Uma vez que as células dendríticas exibem papel importante na apresentação de antígenos via moléculas do MHC de classe II, são também induzidos em pacientes de DM1 de longa data, pode-se presumir que a apresentação de antígenos (próprios ou não-próprios) é um fenômeno de longa duração em DM1. Por outro lado, pacientes com DM1 apresentaram genes reprimidos associados aos linfócitos B1a e B1b (células B *naive*) (Figura 21-A), no qual o linfócito B1a (CD5+) tem sido associado com a produção de autoanticorpos naturais (WONG *et al.*, 2010). Infelizmente, não temos a informação relacionada com os padrões gênicos de células B ativadas. Outro achado importante é a similaridade dos perfis de expressão dos

pacientes DM1 com aqueles observados para a nefropatia diabética (Figura 21-A), conforme relatado em bancos de dados públicos (Phenopedia). Uma vez que todos os pacientes do nosso grupo não exibiam nefropatia clinicamente detectada, esse achado pode ser explorado em estudos futuros de acompanhamento de pacientes, em particular naqueles que exibem a expressão de padrões gênicos associados com a nefropatia.

Finalmente, os pacientes DM2 exibiram perfis de expressão gênica que estavam em desacordo com aqueles reportados em bancos de dados públicos (Phenopedia) para complicações diabéticas (Figuras 21-A, C e D). Considerando que metade dos nossos pacientes exibiram valores médios de glicose mais altos em relação aos pacientes com DM1 ou com DMG, era esperado que ocorresse a indução de genes associados com complicações diabéticas. Uma vez que pacientes com DM2 foram tratados com muitos tipos de medicações, além dos hipoglicemiantes, é possível que esse resultado possa ser consequência do tratamento instituído a esses pacientes. Outra possível explicação pode estar relacionada aos genes de inflamação, que foram reprimidos em DM2 em relação aos pacientes DM1 e DMG. Dessa forma, o conjunto de inflamação e drogas usadas para tratar o DM2 poderia ter sido o responsável por esses achados. Além disso, o uso de metformina e outras medicações (aspirina, captopril, atorvastatina e hidroclorotiazida) parecem modular a expressão de um grande número de genes, possivelmente afetando o *status* inflamatório dos pacientes com DM2. Alguns dos genes reprimidos observados em pacientes DM2 (em tratamento com várias drogas) incluem *IL1B*, *IL4*, *IL8*, *CCL2* e *TNF*, todos eles envolvidos no processo inflamatório, que foram também modulados em macrófagos (Figura 20).

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

Pacientes com DM1, DM2 e DMG exibiram perfis de expressão característicos de cada grupo, sendo os perfis de expressão entre DM1 e DMG mais próximos em relação ao DM2, estando os genes relacionados com inflamação associados com as semelhanças entre DM1 e DMG, particularmente, com os perfis transcricionais de macrófagos e células dendríticas,

Em cada tipo de diabetes, características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais, imunológicas, genéticas e terapêuticas influenciaram os perfis transcricionais.

Foram identificados diversos genes específicos ou compartilhados pelos diversos tipos de diabetes, relacionados com obesidade, complicações micro e macrovasculares, processos inflamatórios e mecanismos patogênicos para serem investigados em estudos complementares.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

- ALBERTI, K. G.; 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: A Journal of the British Diabetic Association**, v. 15, n. 7, p. 539-553, jul 1998.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 34 Suppl 1, p. S62-69, jan 2011.
- ANJOS, S.; POLYCHRONAKOS, CONSTANTIN. Mechanisms of genetic susceptibility to type I diabetes: beyond HLA. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 81, n. 3, p. 187-195, mar 2004.
- BAHADORI, B.; UITZ, E.; MAYER, A. *et al.* Polymorphisms of the hypoxia-inducible factor 1 gene and peripheral artery disease. **Vascular Medicine (London, England)**, v. 15, n. 5, p. 371-374, out 2010.
- BARBOUR, L. A.; MCCURDY, C. E.; HERNANDEZ, T. L. *et al.* Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S112-119, jul 2007.
- BARKER, J. M.; BARRIGA, K. J.; YU, L. *et al.* Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 8, p. 3896-3902, ago 2004.
- BARRETT, J. C.; CLAYTON, D. G.; CONCANNON, P. *et al.* Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. **Nature Genetics**, v. 41, n. 6, p. 703-707, jun 2009.
- BECKLES, G. L.; ZHU, J.; MOONESINGHE, R. Diabetes - United States, 2004 and 2008. **MMWR. Surveillance Summaries: Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries / CDC**, v. 60 Suppl, p. 90-93, 14 jan 2011.
- BELL, G I; HORITA, S.; KARAM, J. H. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 33, n. 2, p. 176-183, fev 1984.
- BELLAMY, L.; CASAS, J.-P.; HINGORANI, A. D.; WILLIAMS, D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 373, n. 9677, p. 1773-1779, 23 maio 2009.
- BELLE, T. L. VAN; COPPIETERS, K. T.; HERRATH, M. G. VON. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 79-118, jan 2011.
- BENER, A.; SALEH, N. M.; AL-HAMAM, A. Prevalence of gestational diabetes and associated maternal and neonatal complications in a fast-developing community: global comparisons. **International Journal of Women's Health**, v. 3, p. 367-373, 2011.
- BEN-HAROUSH, A.; YOGEV, Y.; HOD, M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine: A Journal of the British**

Diabetic Association, v. 21, n. 2, p. 103-113, fev 2004.

BERNAL-LOPEZ, R. M.; LLORENTE-CORTES, V.; LÓPEZ-CARMONA, D. *et al.* Modulation of human monocyte CD36 by type 2 diabetes mellitus and other atherosclerotic risk factors. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 41, n. 8, p. 854-862, ago 2011.

BILLINGS, L. K.; FLOREZ, JOSE C. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1212, p. 59-77, nov 2010.

BLASIAK, J.; ARABSKI, M.; KRUPA, R. *et al.* DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. **Mutation Research**, v. 554, n. 1-2, p. 297-304, 4 out 2004.

BOLSTAD, B M; IRIZARRY, R A; ASTRAND, M.; SPEED, T. P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 19, n. 2, p. 185-193, 22 jan 2003.

BOTTINI, N.; MUSUMECI, L.; ALONSO, A. *et al.* A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. **Nature Genetics**, v. 36, n. 4, p. 337-338, abr 2004.

BOUATIA-NAJI, N.; ROCHELEAU, G.; LOMMEL, L. VAN; *et al.* A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. **Science (New York, N.Y.)**, v. 320, n. 5879, p. 1085-1088, 23 maio 2008.

BRITTEN, A. C.; MIJOVIC, C. H.; BARNETT, A. H.; KELLY, M. A. Differential expression of HLA-DQ alleles in peripheral blood mononuclear cells: alleles associated with susceptibility to and protection from autoimmune type 1 diabetes. **International Journal of Immunogenetics**, v. 36, n. 1, p. 47-57, fev 2009.

BUCHANAN, T. A.; KJOS, S. L. Counterpoint: glucose monitoring in gestational diabetes: lots of heat, not much light. **Diabetes Care**, v. 26, n. 3, p. 948-949, mar 2003.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestational diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 485-491, mar 2005.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A.; KJOS, S. L.; WATANABE, R. What is gestational diabetes? **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S105-111, jul 2007.

BUNT, M. VAN DE; GLOYN, A. L. From genetic association to molecular mechanism. **Current Diabetes Reports**, v. 10, n. 6, p. 452-466, dez 2010.

CANTÓ, C.; GERHART-HINES, Z.; FEIGE, J. N. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. **Nature**, v. 458, n. 7241, p. 1056-1060, 23 abr 2009.

CAUCHI, S.; MEYRE, D.; DURAND, E. *et al.* Post genome-wide association studies of novel genes associated with type 2 diabetes show gene-gene interaction and high predictive value. **PloS One**, v. 3, n. 5, p. e2031, 2008.

CESBRON-GAUTIER, A.; SIMON, P.; ACHARD, L. *et al.* [Luminex technology for HLA typing by PCR-SSO and identification of HLA antibody specificities]. **Annales De Biologie Clinique**, v. 62, n. 1, p. 93-98, fev 2004.

CHEN, X.; WANG, L.; HU, B. *et al.* Pathway-based analysis for genome-wide association

studies using supervised principal components. **Genetic Epidemiology**, v. 34, n. 7, p. 716-724, nov 2010.

CHENG, K.; HO, K.; STOKES, R. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α regulates beta cell function in mouse and human islets. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 6, p. 2171-2183, 1 jun 2010.

CHENTOUFI, A. A.; BINDER, N. R.; BERKA, N.; ABUNADI, T.; POLYCHRONAKOS, C. Advances in type I diabetes associated tolerance mechanisms. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 68, n. 1, p. 1-11, jul 2008.

CHESSEL, D.; DUFOUR, A. B.; THIOULOUSE, J. The ade4 package - I : One-table methods. v. 4, p. 5-10, 2004.

CHO, Y. M.; KIM, T. H.; LIM, S. *et al.* Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. **Diabetologia**, v. 52, n. 2, p. 253-261, fev 2009.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-534, 536-537, set 1993.

CIPOLLETTA, C.; RYAN, K. E.; HANNA, E. V.; TRIMBLE, E. R. Activation of peripheral blood CD14⁺ monocytes occurs in diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 9, p. 2779-2786, set 2005.

COLLARES, C. V. A.; EVANGELISTA, A F; XAVIER, D. J. *et al.* Transcriptome metanalysis of peripheral blood mononuclear cells of type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus patients features modulated immune system and metabolism genes. v. 32, n. Issue 3_Meeting Abstracts in The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting & Expo, 2011, Boston, MA, 2011.

CROWTHER, C. A.; HILLER, J. E.; MOSS, J. R. *et al.* Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 24, p. 2477-2486, 16 jun 2005.

DARROW, A. L.; SHOHET, R. V.; MARESH, J. G. Transcriptional analysis of the endothelial response to diabetes reveals a role for galectin-3. **Physiological Genomics**, v. 43, n. 20, p. 1144-1152, 20 out 2011.

DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis. Disponível em: <<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>>. Acesso em: 16 jan. 2012.

DEVARAJ, S.; SINGH, U.; JIALAL, I. Human C-reactive protein and the metabolic syndrome. **Current Opinion in Lipidology**, v. 20, n. 3, p. 182-189, jun 2009.

DEY, P.; GUPTA, P.; ACHARYA, N. K. *et al.* Antioxidants and lipid peroxidation in gestational diabetes--a preliminary study. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 52, n. 2, p. 149-156, jun 2008.

DIAMOND PROJECT GROUP. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. **Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association**, v. 23, n. 8, p. 857-866, ago 2006.

DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nature**

Reviews. Immunology, v. 11, n. 2, p. 98-107, fev 2011.

EISEN, M. B.; SPELLMAN, P. T.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14863-14868, 8 dez 1998.

EISENBARTH, GEORGE S; JEFFREY, J. The natural history of type 1A diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 146-155, mar 2008.

ESAKOFF, T. F.; CHENG, Y. W.; CAUGHEY, A. B. Screening for gestational diabetes: different cut-offs for different ethnicities? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 193, n. 3 Pt 2, p. 1040-1044, set 2005.

EVANS, D. C.; SILESHI, B.; ZAKARIA, A. M. *et al.* Genomic modeling of atherosclerosis in peripheral arterial disease and its variant phenotype in patients with diabetes. **Vascular**, v. 16, n. 4, p. 225-235, ago 2008.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 1-8, jan 2003.

FARRELL, R. E. **RNA Methodologies - Elsevier**. 4. ed. Penn State University, York, PA, U.S.A.: Academic Press, 2009.

FERNANDES, A P M; FOSS, M C; DONADI, E A. HLA-DQB1 alleles may influence the surface expression of DQ molecules in lymphomononuclear cells of type 1 diabetes mellitus patients. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, n. 3, p. 305-309, mar 2004.

FERNANDES, A P M; LOUZADA-JUNIOR, P.; FOSS, M C; DONADI, E A. HLA-DRB1, DQB1, and DQA1 allele profile in Brazilian patients with type 1 diabetes mellitus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 958, p. 305-308, abr 2002.

FERREIRA, S. R.; FRANCO, L. J.; VIVOLO, M. A. *et al.* Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. **Diabetes Care**, v. 16, n. 5, p. 701-704, maio 1993.

FLOREZ, J C. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: where are the insulin resistance genes? **Diabetologia**, v. 51, n. 7, p. 1100-1110, jul 2008.

FORNARI, T. A.; DONATE, P. B.; MACEDO, CLAUDIA; *et al.* Development of type 1 diabetes mellitus in nonobese diabetic mice follows changes in thymocyte and peripheral T lymphocyte transcriptional activity. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2011, p. 158735, 2011.

FREINKEL, N.; METZGER, B E; PHELPS, R. L. *et al.* Gestational diabetes mellitus: a syndrome with phenotypic and genotypic heterogeneity. **Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme**, v. 18, n. 7, p. 427-430, jul 1986.

G4140-90040_GeneExpression_One-color_v6.5.pdf (objeto application/pdf). . [S.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90040_GeneExpression_One-color_v6.5.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012. , [S.d.]

GAULTON, K. J.; NAMMO, T.; PASQUALI, L. *et al.* A map of open chromatin in human

pancreatic islets. **Nature Genetics**, v. 42, n. 3, p. 255-259, mar 2010.

GAUTIER, L.; COPE, L.; BOLSTAD, BENJAMIN M; IRIZARRY, RAFAEL A. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 20, n. 3, p. 307-315, 12 fev 2004.

GHOSH, S.; DENT, R.; HARPER, M.-E. *et al.* Gene expression profiling in whole blood identifies distinct biological pathways associated with obesity. **BMC Medical Genomics**, v. 3, p. 56, 2010.

GIBBONS, D. L.; ABELER-DÖRNER, L.; RAINE, T. *et al.* Cutting Edge: Regulator of G protein signaling-1 selectively regulates gut T cell trafficking and colitic potential. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 187, n. 5, p. 2067-2071, 1 set 2011.

GORLOV, I. P.; GALLICK, G. E.; GORLOVA, O. Y.; AMOS, C.; LOGOTHETIS, C. J. GWAS meets microarray: are the results of genome-wide association studies and gene-expression profiling consistent? Prostate cancer as an example. **PloS One**, v. 4, n. 8, p. e6511, 2009.

GRAHAM, J.; HAGOPIAN, W. A.; KOCKUM, INGRID; *et al.* Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1346-1355, maio 2002.

GRINBERG-BLEYER, Y.; BAEYENS, A.; YOU, S. *et al.* IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 9, p. 1871-1878, 30 ago 2010.

GUARDA, G.; DOSTERT, C.; STAEHLI, F. *et al.* T cells dampen innate immune responses through inhibition of NLRP1 and NLRP3 inflammasomes. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 269-273, 9 jul 2009.

GUNDERSON, E. P.; MATIAS, S. L.; HURSTON, S. R. *et al.* Study of Women, Infant Feeding, and Type 2 diabetes mellitus after GDM pregnancy (SWIFT), a prospective cohort study: methodology and design. **BMC Public Health**, v. 11, n. 1, p. 952, 23 dez 2011.

HAKONARSON, H.; GRANT, S. F. A. GWAS and its impact on elucidating the etiology of diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, 1 jun 2011.

HAN, D.; LEYVA, C. A.; MATHESON, D. *et al.* Immune profiling by multiple gene expression analysis in patients at-risk and with type 1 diabetes. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 139, n. 3, p. 290-301, jun 2011.

HANAUER, D. A.; RHODES, D. R.; SINHA-KUMAR, C.; CHINNAIYAN, A. M. Bioinformatics approaches in the study of cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 7, n. 1, p. 133-141, fev 2007.

HAYASHI, Y.; KAJIMOTO, K.; IIDA, S. *et al.* DNA microarray analysis of whole blood cells and insulin-sensitive tissues reveals the usefulness of blood RNA profiling as a source of markers for predicting type 2 diabetes. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 6, p. 1033-1042, 2010.

HENG, T. S. P.; PAINTER, M. W. The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 10, p. 1091-1094, out 2008.

- HINKS, A.; MARTIN, P.; FLYNN, E. *et al.* Investigation of type 1 diabetes and coeliac disease susceptibility loci for association with juvenile idiopathic arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 12, p. 2169-2172, dez 2010.
- HIRSCHHORN, J. N. Genetic epidemiology of type 1 diabetes. **Pediatric Diabetes**, v. 4, n. 2, p. 87-100, jun 2003.
- HOEK, M. VAN; DEGHAN, A.; WITTEMAN, J. C. M. *et al.* Predicting type 2 diabetes based on polymorphisms from genome-wide association studies: a population-based study. **Diabetes**, v. 57, n. 11, p. 3122-3128, nov 2008.
- HomoloGene Home**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- HONG, F.; BREITLING, R.; MCENTEE, C. W. *et al.* RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 22, n. 22, p. 2825-2827, 15 nov 2006.
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; TAN, Q. *et al.* DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W169-175, jul 2007.
- HuGENavigator|GWAS Integrator|Search**. Disponível em: <<http://hugenavigator.net/HuGENavigator/gWAHitStartPage.do>>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- HuGENavigator|PhenoPedia|Search**. Disponível em: <<http://hugenavigator.net/HuGENavigator/startPagePhenoPedia.do>>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- HUNT, K. J.; SCHULLER, K. L. The increasing prevalence of diabetes in pregnancy. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 173-199, vii, jun 2007.
- HWANG, I. Y.; PARK, C.; HARRISON, K. A.; HUANG, N. N.; KEHRL, J. H. Variations in Gnai2 and Rgs1 expression affect chemokine receptor signaling and the organization of secondary lymphoid organs. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 5, p. 384-396, jul 2010.
- ILONEN, J.; SJÖROOS, M.; KNIP, MIKAEL; *et al.* Estimation of genetic risk for type 1 diabetes. **American Journal of Medical Genetics**, v. 115, n. 1, p. 30-36, 30 maio 2002.
- Immunological Genome Project (ImmGen)**. Disponível em: <http://www.immgen.org/index_content.html>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- International Diabetes Federation**. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas/>>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS CONSSORTIUM (IMSGC). IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and RGS1 are novel multiple sclerosis susceptibility loci. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 5, p. 397-405, jul 2010.
- JIN, J.; SAMUVEL, D. J.; ZHANG, X. *et al.* Coactivation of TLR4 and TLR2/6 coordinates an additive augmentation on IL-6 gene transcription via p38MAPK pathway in U937 mononuclear cells. **Molecular Immunology**, v. 49, n. 3, p. 423-432, dez 2011.
- KAAJA, R.; RÖNNEMAA, T. Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to

mother and offspring. **The Review of Diabetic Studies: RDS**, v. 5, n. 4, p. 194-202, 2008.

KAHN, C R. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, v. 43, n. 8, p. 1066-1084, ago 1994.

KAIZER, E. C.; GLASER, C. L.; CHAUSSABEL, D. *et al.* Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 9, p. 3705-3711, set 2007.

KARUMUTHIL-MELETHIL, S.; PEREZ, N.; LI, R.; VASU, C. Induction of innate immune response through TLR2 and dectin 1 prevents type 1 diabetes. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 181, n. 12, p. 8323-8334, 15 dez 2008.

KARVONEN, M.; VIIK-KAJANDER, M.; MOLTCHANOVA, E. *et al.* Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. **Diabetes Care**, v. 23, n. 10, p. 1516-1526, out 2000.

KAUTZKY-WILLER, A.; HANDISURYA, A. Metabolic diseases and associated complications: sex and gender matter! **European Journal of Clinical Investigation**, v. 39, n. 8, p. 631-648, ago 2009.

KNIP, MIKAEL; KUKKO, M.; KULMALA, PETRI; *et al.* Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA-defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes. **American Journal of Medical Genetics**, v. 115, n. 1, p. 48-54, 30 maio 2002.

KNIP, MIKAEL; SILJANDER, H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 7, p. 550-557, jul 2008.

KOCKUM, I; SANJEEVI, C B; EASTMAN, S. *et al.* Complex interaction between HLA DR and DQ in conferring risk for childhood type 1 diabetes. **European Journal of Immunogenetics: Official Journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 26, n. 5, p. 361-372, out 1999.

LAIN, K. Y.; CATALANO, P. M. Metabolic changes in pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 50, n. 4, p. 938-948, dez 2007.

LAPOLLA, A.; DALFRÀ, M. G.; FEDELE, D. Diabetes related autoimmunity in gestational diabetes mellitus: is it important? **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD**, v. 19, n. 9, p. 674-682, nov 2009.

LAUENBORG, J.; GRARUP, N.; DAMM, P. *et al.* Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 1, p. 145-150, jan 2009.

LAUENBORG, J.; HANSEN, T.; JENSEN, D. M. *et al.* Increasing incidence of diabetes after gestational diabetes: a long-term follow-up in a Danish population. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1194-1199, maio 2004.

LAWSON, V. J.; WESTON, K.; MAURICE, D. Early growth response 2 regulates the survival of thymocytes during positive selection. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 1, p. 232-241, jan 2010.

LI, S.; SYMONDS, A. L. J.; ZHU, B. *et al.* Early growth response gene-2 (Egr-2) regulates the development of B and T cells. **PloS One**, v. 6, n. 4, p. e18498, 2011.

- LI, X.; THOMASON, P. A.; WITHERS, D. J.; SCOTT, J. Bio-informatics analysis of a gene co-expression module in adipose tissue containing the diet-responsive gene Nnat. **BMC Systems Biology**, v. 4, p. 175, 2010.
- LISBÔA, H. R.; GRAEBIN, R.; BUTZKE, L.; RODRIGUES, C. S. Incidence of type 1 diabetes mellitus in Passo Fundo, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et AL.]**, v. 31, n. 12, p. 1553-1556, dez 1998.
- LOPEZ, F.; TEXTORIS, J.; BERGON, A. *et al.* TranscriptomeBrowser: a powerful and flexible toolbox to explore productively the transcriptional landscape of the Gene Expression Omnibus database. **PloS One**, v. 3, n. 12, p. e4001, 2008.
- MAAHS, D. M.; WEST, N. A.; LAWRENCE, J. M.; MAYER-DAVIS, E. J. Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, n. 3, p. 481-497, set 2010.
- MACIAS-GONZALEZ, M.; CARDONA, F.; QUEIPO-ORTUÑO, M. *et al.* PPARgamma mRNA expression is reduced in peripheral blood mononuclear cells after fat overload in patients with metabolic syndrome. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 5, p. 903-907, maio 2008.
- MAIDA, A.; LAMONT, B. J.; CAO, X.; DRUCKER, D. J. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. **Diabetologia**, v. 54, n. 2, p. 339-349, fev 2011.
- MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**, v. 15, n. 11, p. 1509-1516, nov 1992.
- MARSELLI, L.; THORNE, J.; DAHIYA, S. *et al.* Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. **PloS One**, v. 5, n. 7, p. e11499, 2010.
- MCCARTHY, MARK I; ZEGGINI, ELEFThERIA. Genome-wide association studies in type 2 diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 9, n. 2, p. 164-171, abr 2009.
- METZGER, BOYD E; LOWE, L. P.; DYER, A. R. *et al.* Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 19, p. 1991-2002, 8 maio 2008.
- MIAME - Workgroups - FGED**. Disponível em: <<http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>>. Acesso em: 16 jan. 2012.
- MIAO, L.; ST CLAIR, D. K. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 4, p. 344-356, 15 ago 2009.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. CADERNOS DE ATENÇÃO BÁSICA – Diabetes Mellitus. **Cadernos de Atenção Básica**, A. Normas e Manuais Técnicos. n. 16, p. 64, 2006.
- MOORE, A. F.; FLOREZ, JOSE C. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and implications for antidiabetic therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 95-111, 2008.

MULLA, W. R.; HENRY, T. Q.; HOMKO, C. J. Gestational diabetes screening after HAPO: has anything changed? **Current Diabetes Reports**, v. 10, n. 3, p. 224-228, jun 2010.

MURGIA, C.; ORRÙ, M.; PORTOGHESE, E. *et al.* Autoimmunity in gestational diabetes mellitus in Sardinia: a preliminary case-control report. **Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E**, v. 6, p. 24, 2008.

MYOZEN, K.; KOCHI, Y.; SHIMANE, K. *et al.* Regulatory polymorphisms in EGR2 are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 11, p. 2313-2320, 1 jun 2010.

NASSAR, A. H.; FAYYUMY, R.; SAAB, W.; MEHIO, G.; USTA, I. M. Grandmultiparas in modern obstetrics. **American Journal of Perinatology**, v. 23, n. 6, p. 345-349, ago 2006.

NEJENTSEV, S.; HOWSON, J. M. M.; WALKER, N. M. *et al.* Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 887-892, 6 dez 2007.

NERUP, J.; PLATZ, P.; ANDERSEN, O. O. *et al.* HL-A antigens and diabetes mellitus. **Lancet**, v. 2, n. 7885, p. 864-866, 12 out 1974.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X. L. *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 787-790, 13 abr 2000.

NOBLE, J. A.; VALDES, A. M.; COOK, M. *et al.* The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. **American Journal of Human Genetics**, v. 59, n. 5, p. 1134-1148, nov 1996.

NOTKINS, A. L.; LERNMARK, A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 9, p. 1247-1252, nov 2001.

NOVAK, J.; LEHUEN, A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. **Cytokine**, v. 53, n. 3, p. 263-270, mar 2011.

OKAMURA, T.; FUJIO, K.; SHIBUYA, M. *et al.* CD4+CD25-LAG3+ regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 13974-13979, 18 ago 2009.

ORTEGA-SENOVILLA, H.; SCHAEFER-GRAF, U.; MEITZNER, K. *et al.* Gestational diabetes mellitus causes changes in the concentrations of adipocyte fatty acid-binding protein and other adipocytokines in cord blood. **Diabetes Care**, v. 34, n. 9, p. 2061-2066, set 2011.

OWEN, K. R.; MCCARTHY, MARK I. Genetics of type 2 diabetes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17, n. 3, p. 239-244, jun 2007.

OZSARI, L.; KARADURMUS, N.; SAHIN, M. *et al.* Comparison of lymphomononuclear cell energy metabolism between healthy, impaired glucose intolerance and type 2 diabetes mellitus patients. **Endocrine**, v. 37, n. 1, p. 135-139, fev 2010.

PAPADOPOULOU, A.; LYNCH, K. F.; SHAAT, N; *et al.* The type 1 diabetes protective HLA DQB1*0602 allele is less frequent in gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1339-1342, jul 2009.

- PARIKH, HEMANG; LYSENKO, V.; GROOP, L. C. Prioritizing genes for follow-up from genome wide association studies using information on gene expression in tissues relevant for type 2 diabetes mellitus. **BMC Medical Genomics**, v. 2, p. 72, 2009.
- PERRY, J. R. B.; FRAYLING, TIMOTHY M. New gene variants alter type 2 diabetes risk predominantly through reduced beta-cell function. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 11, n. 4, p. 371-377, jul 2008.
- PLAGNOL, V.; HOWSON, J. M. M.; SMYTH, D. J. *et al.* Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 8, p. e1002216, ago 2011.
- PLANAS, R.; PUJOL-BORRELL, R.; VIVES-PI, M. Global gene expression changes in type 1 diabetes: insights into autoimmune response in the target organ and in the periphery. **Immunology Letters**, v. 133, n. 2, p. 55-61, 30 out 2010.
- POCIOT, F.; AKOLKAR, B.; CONCANNON, P. *et al.* Genetics of type 1 diabetes: what's next? **Diabetes**, v. 59, n. 7, p. 1561-1571, jul 2010.
- PRICCI, F.; LETO, G.; AMADIO, L. *et al.* Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products. **Kidney International. Supplement**, v. 77, p. S31-39, set 2000.
- PROKOPENKO, I.; MCCARTHY, MARK I; LINDGREN, C. M. Type 2 diabetes: new genes, new understanding. **Trends in Genetics: TIG**, v. 24, n. 12, p. 613-621, dez 2008.
- RADAELLI, T.; LEPERCQ, J.; VARASTEHPOUR, A. *et al.* Differential regulation of genes for fetoplacental lipid pathways in pregnancy with gestational and type 1 diabetes mellitus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 201, n. 2, p. 209.e1-209.e10, ago 2009.
- RASSI, DIANE MEYRE; JUNTA, C. M.; FACHIN, A. L. *et al.* Gene expression profiles stratified according to type 1 diabetes mellitus susceptibility regions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1150, p. 282-289, dez 2008.
- REDONDO, M J; EISENBARTH, G S. Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. **Diabetologia**, v. 45, n. 5, p. 605-622, maio 2002.
- REDONDO, M J; FAIN, P. R.; EISENBARTH, G S. Genetics of type 1A diabetes. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 56, p. 69-89, 2001.
- REDONDO, MARIA J; BABU, S.; ZEIDLER, A. *et al.* Specific human leukocyte antigen DQ influence on expression of antiislet autoantibodies and progression to type 1 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 5, p. 1705-1713, maio 2006.
- REYNIER, F.; PACHOT, A.; PAYE, M. *et al.* Specific gene expression signature associated with development of autoimmune type-I diabetes using whole-blood microarray analysis. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 3, p. 269-278, abr 2010.
- ROBITAILLE, J.; GRANT, A. M. The genetics of gestational diabetes mellitus: evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus. **Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics**, v. 10, n. 4, p. 240-250, abr 2008.
- ROJAS-VILLARRAGA, A.; BOTELLO-CORZO, D.; ANAYA, J.-M. HLA-Class II in Latin

- American patients with type 1 diabetes. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 10, p. 666-673, ago 2010.
- ROMAN, H.; ROBILLARD, P.-Y.; VERSPYCK, E. *et al.* Obstetric and neonatal outcomes in grand multiparity. **Obstetrics and Gynecology**, v. 103, n. 6, p. 1294-1299, jun 2004.
- ROSA, R. S.; SCHMIDT, MARIA INES. Diabetes mellitus:magnitude das hospitalizaçõesna rede pública do Brasil, 1999-2001. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 17, n. 2, p. 123-153, 2008.
- SAUCEDO, R.; ZARATE, A.; BASURTO, L. *et al.* Relationship between circulating adipokines and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes. **Archives of Medical Research**, v. 42, n. 4, p. 318-323, maio 2011.
- SAVIC, D.; YE, H.; ANEAS, I. *et al.* Alterations in TCF7L2 expression define its role as a key regulator of glucose metabolism. **Genome Research**, v. 21, n. 9, p. 1417-1425, set 2011.
- SAVOLA, K.; LÄÄRÄ, E.; VÄHÄSALO, P. *et al.* Dynamic pattern of disease-associated autoantibodies in siblings of children with type 1 diabetes: a population-based study. **Diabetes**, v. 50, n. 11, p. 2625-2632, nov 2001.
- SCHMIDT, M I; MATOS, M. C.; REICHELT, A. J. *et al.* Prevalence of gestational diabetes mellitus--do the new WHO criteria make a difference? Brazilian Gestational Diabetes Study Group. **Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association**, v. 17, n. 5, p. 376-380, maio 2000.
- SEGAL, E.; FRIEDMAN, N.; KOLLER, D.; REGEV, A. A module map showing conditional activity of expression modules in cancer. **Nature Genetics**, v. 36, n. 10, p. 1090-1098, out 2004.
- SEGHROUCHNI, I.; DRAI, J.; BANNIER, E. *et al.* Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 321, n. 1-2, p. 89-96, jul 2002.
- SEINO, S.; SHIBASAKI, T.; MINAMI, K. Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2118-2125, 1 jun 2011.
- SHAAT, N; KARLSSON, E.; LERNMARK, A; *et al.* Common variants in MODY genes increase the risk of gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 49, n. 7, p. 1545-1551, jul 2006.
- SHAAT, NAEL; GROOP, LEIF. Genetics of gestational diabetes mellitus. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 569-583, 2007.
- SIA, C. Replenishing Peripheral CD4(+) Regulatory T Cells: A Possible Immune-Intervention Strategy in Type 1 Diabetes? **The Review of Diabetic Studies: RDS**, v. 3, n. 3, p. 102-107, 2006.
- SINGAL, D. P.; BLAJCHMAN, M. A. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 22, n. 6, p. 429-432, jun 1973.
- SMYTH, D. J.; PLAGNOL, V.; WALKER, N. M. *et al.* Shared and distinct genetic variants

in type 1 diabetes and celiac disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 26, p. 2767-2777, 25 dez 2008.

SMYTH, D.; COOPER, J. D.; COLLINS, J. E. *et al.* Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. **Diabetes**, v. 53, n. 11, p. 3020-3023, nov 2004.

SONG, J.; REN, P.; ZHANG, L. *et al.* Metformin reduces lipid accumulation in macrophages by inhibiting FOXO1-mediated transcription of fatty acid-binding protein 4. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 1, p. 89-94, 26 fev 2010.

SUJI, G.; SIVAKAMI, S. DNA damage by free radical production by aminoguanidine. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1067, p. 191-199, maio 2006.

SUSZTAK, K.; SHARMA, K.; SCHIFFER, M. *et al.* Genomic strategies for diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 14, n. 8 Suppl 3, p. S271-278, ago 2003.

TAGC - INSERM U928 - AgiND. Disponível em: <<http://tagc.univ-mrs.fr/welcome/spip.php?rubrique194>>. Acesso em: 16 jan. 2012.

TANNAHILL, G. M.; O'NEILL, L. A. J. The emerging role of metabolic regulation in the functioning of Toll-like receptors and the NOD-like receptor Nlrp3. **FEBS Letters**, v. 585, n. 11, p. 1568-1572, 6 jun 2011.

THANGARAJAH, H.; VIAL, I. N.; GROGAN, R. H. *et al.* HIF-1alpha dysfunction in diabetes. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 9, n. 1, p. 75-79, 1 jan 2010.

The Perl Programming Language - www.perl.org. Disponível em: <<http://www.perl.org/>>. Acesso em: 16 jan. 2012.

The R Project for Statistical Computing. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>. Acesso em: 16 jan. 2012.

THOMAS, A. W.; DAVIES, N. A.; MOIR, H. *et al.* Exercise-associated generation of PPAR γ ligands activates PPAR γ signalling events and upregulates genes related to lipid metabolism. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, 15 dez 2011.

TISCH, R.; WANG, B. Dysregulation of T cell peripheral tolerance in type 1 diabetes. **Advances in Immunology**, v. 100, p. 125-149, 2008.

TODD, J A. Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genome approaches. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 19, p. 8560-8565, 12 set 1995.

TODD, JOHN A. Etiology of type 1 diabetes. **Immunity**, v. 32, n. 4, p. 457-467, 23 abr 2010.

TORLONI, M. R.; BETRÁN, A. P.; HORTA, B. L. *et al.* Prepregnancy BMI and the risk of gestational diabetes: a systematic review of the literature with meta-analysis. **Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 10, n. 2, p. 194-203, mar 2009.

TÖRN, C.; GUPTA, M.; SANJEEVI, CARANI B; ABERG, A.; FRID, A.; LANDIN-OLSSON, MONA. Different HLA-DR-DQ and MHC class I chain-related gene A (MICA)

genotypes in autoimmune and nonautoimmune gestational diabetes in a Swedish population. **Human Immunology**, v. 65, n. 12, p. 1443-1450, dez 2004a.

TÖRN, C.; GUPTA, M.; SANJEEVI, CARANI B; ABERG, A.; FRID, A.; LANDIN-OLSSON, MONA. Different HLA-DR-DQ and MHC class I chain-related gene A (MICA) genotypes in autoimmune and nonautoimmune gestational diabetes in a Swedish population. **Human Immunology**, v. 65, n. 12, p. 1443-1450, dez 2004b.

TORQUATO, M. T.; MONTENEGRO JÚNIOR, R. M.; VIANA, L. A. *et al.* Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. **São Paulo Medical Journal = Revista Paulista De Medicina**, v. 121, n. 6, p. 224-230, 6 nov 2003.

TranscriptomeBrowser: data mining of public microarray data. Disponível em: <<http://tagc.univ-mrs.fr/tbrowser/>>. Acesso em: 16 jan. 2012.

UNGER, J. **Diabetes Management in the Primary Care. 1 - Introduction to Diabetes.** 1. ed. [S.l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAMBERGUE, A.; FAJARDY, I.; BIANCHI, F. *et al.* Gestational diabetes mellitus and HLA class II (-DQ, -DR) association: The Digest Study. **European Journal of Immunogenetics: Official Journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 24, n. 5, p. 385-394, out 1997.

VOIGHT, B. F.; SCOTT, L. J.; STEINTHORSDDOTTIR, V. *et al.* Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. **Nature Genetics**, v. 42, n. 7, p. 579-589, jul 2010.

WATANABE, R. M.; BLACK, M. H.; XIANG, A. H. *et al.* Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 30 Suppl 2, p. S134-140, jul 2007.

WEBER, M.; SPORRER, D.; WEIGERT, J. *et al.* Adiponectin downregulates galectin-3 whose cellular form is elevated whereas its soluble form is reduced in type 2 diabetic monocytes. **FEBS Letters**, v. 583, n. 22, p. 3718-3724, 19 nov 2009.

WEEDON, M. N.; CLARK, V. J.; QIAN, Y. *et al.* A common haplotype of the glucokinase gene alters fasting glucose and birth weight: association in six studies and population-genetics analyses. **American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. 6, p. 991-1001, dez 2006.

WEEDON, M. N.; MCCARTHY, MARK I; HITMAN, G. *et al.* Combining information from common type 2 diabetes risk polymorphisms improves disease prediction. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 10, p. e374, out 2006.

WELTERS, H. J.; KULKARNI, R. N. Wnt signaling: relevance to beta-cell biology and diabetes. **Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM**, v. 19, n. 10, p. 349-355, dez 2008.

WENZLAU, J. M.; JUHL, K.; YU, L. *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 43, p. 17040-17045, 23 out 2007.

WHEELER, E.; BARROSO, I. Genome-wide association studies and type 2 diabetes. **Briefings in Functional Genomics**, v. 10, n. 2, p. 52-60, mar 2011.

WHO | Facts and figures about diabetes. Disponível em: <<http://www.who.int/diabetes/facts/en/>>. Acesso em: 16 jan. 2012.

WILLIAMS, A. J. K.; AITKEN, R. J.; CHANDLER, M. A.-M. *et al.* Autoantibodies to islet antigen-2 are associated with HLA-DRB1*07 and DRB1*09 haplotypes as well as DRB1*04 at onset of type 1 diabetes: the possible role of HLA-DQA in autoimmunity to IA-2. **Diabetologia**, v. 51, n. 8, p. 1444-1448, ago 2008.

WONG, F. S.; HU, C.; XIANG, Y.; WEN, L. To B or not to B--pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 6, p. 723-731, dez 2010.

WU, C.-H.; YEH, C.-T.; SHIH, P.-H.; YEN, G.-C. Dietary phenolic acids attenuate multiple stages of protein glycation and high-glucose-stimulated proinflammatory IL-1 β activation by interfering with chromatin remodeling and transcription in monocytes. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54 Suppl 2, p. S127-140, jul 2010.

YANG, Y. H.; DUDOIT, S. Normalization: Bioconductor's marray package. 2011.

YU, WEI; YESUPRIYA, A.; WULF, A. *et al.* GWAS Integrator: a bioinformatics tool to explore human genetic associations reported in published genome-wide association studies. **European Journal of Human Genetics: EJHG**, v. 19, n. 10, p. 1095-1099, out 2011.

YU, W.; CLYNE, M.; KHOURY, M J; GWINN, M. Phenopedia and Genopedia: disease-centered and gene-centered views of the evolving knowledge of human genetic associations. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 1, p. 145-146, 1 jan 2010.

ZEGGINI, E; MCCARTHY, M I. TCF7L2: the biggest story in diabetes genetics since HLA? **Diabetologia**, v. 50, n. 1, p. 1-4, jan 2007.

ZHAO, Y.-H.; WANG, D.-P.; ZHANG, L.-L. *et al.* Genomic expression profiles of blood and placenta reveal significant immune-related pathways and categories in Chinese women with gestational diabetes mellitus. **Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association**, v. 28, n. 2, p. 237-246, fev 2011.

ZHONG, H.; BEAULAURIER, J.; LUM, P. Y. *et al.* Liver and adipose expression associated SNPs are enriched for association to type 2 diabetes. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 5, p. e1000932, maio 2010.

ZHU, B.; SYMONDS, A. L. J.; MARTIN, J. E. *et al.* Early growth response gene 2 (Egr-2) controls the self-tolerance of T cells and prevents the development of lupuslike autoimmune disease. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 10, p. 2295-2307, 29 set 2008.

10. ANEXOS

ANEXO A

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
Campus Universitário Monte Alegre, fone: 36366-1000, Fax: 3633-1144
CEP: 14048-900, Ribeirão Preto, São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

1) NOME DA PESQUISA: META-ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELITUS TIPO 1, TIPO 2 E GESTACIONAL

2) PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Diane Meyre Rassi

AS INFORMAÇÕES SUPRA-CITADAS DEVEM SER REDIGIDAS EM TERMOS SIMPLES, CONHECIDOS PELOS PACIENTES E DE FORMA QUE POSSAM ENTENDER:

No diabetes, ocorre diminuição da produção de insulina, fazendo com que o paciente necessite tomar insulina diariamente ou fazer dieta. Algumas pessoas desenvolvem a doença na infância (diabetes do tipo 1), outras na fase adulta (diabetes do tipo 2) e outras durante a gravidez (diabetes gestacional). Os motivos pelos quais os pacientes desenvolvem diabetes não são bem conhecidos. Para entender um pouco mais sobre os mecanismos associados com o desenvolvimento do diabetes, estamos propondo estudar os diversos tipos da doença (tipo 1, tipo 2 e gestacional), comparando algumas características, presentes no sangue, que são comuns a todos os tipos de diabetes, e outras que são observadas somente em cada tipo de diabetes. Para fazer este estudo, estamos pedindo ao Sr., Sra., ou responsável pelo paciente, a permissão para colher 10 mL de sangue (correspondente a 1 colher de sopa). O principal desconforto deste estudo é a picada da agulha, durante a colheita de sangue. Para evitar a colheita de sangue somente para este estudo, pretendemos colher o sangue em um dos seus retornos no hospital. Este estudo não traz benefício imediato ao doente, mas poderá, no futuro, trazer contribuições para os grupos de pacientes que vierem apresentar o diabetes, adotando medidas que poderão retardar ou impedir a progressão da doença.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu, _____

Registro Geral N° _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

1 – A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido;

2 – A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;

3 – A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;

4 – O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que essa possa afetar minha vontade de continuar participando;

5 – A disponibilidade de tratamento médico e indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição de Saúde, em caso de danos que a justifiquem diretamente causados pela pesquisa e;

6 – Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

7 – Caso exista qualquer tipo de problema ou dúvidas gerais, questionamentos sobre a pesquisa, entrar em contato com a pesquisadora responsável, Dra. Diane Meyre Rassi, pelos telefones: (16) 3602-2566, (16) 3602-3246 ou (16) 8122-8949 ou e-mail: dianerassi@usp.br

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____

Assinatura do paciente

ANEXO B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

CÓPIA

Ribeirão Preto, 11 de novembro de 2008

Ofício nº 4031/2008
CEP/SPC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado "META-ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1, TIPO 2 E GESTACIONAL", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 276ª Reunião Ordinária realizada em 10/11/2008 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 9153/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
DIANE MEYRE RASSI
PROF. DR. EDUARDO ANTÔNIO DONADI (Supervisor)
Depto. de Clínica Médica

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA - 0000 2733; IRB - 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO C

Identificação do paciente	Nome	Idade (anos)	Tempo de doença (anos)	Sexo	Glicemia (mg/dL)	Hb1Ac	Uso de insulina	Uso de metformina	Uso de outras medicações	Tempo de gestação	Número de gestações
DM1-1	S. A. S.	36	11	M	213	10,8	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-2	A. M. F.	26	10	M	197	8,3	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-3	R. M. S.	24	8	M	260	10,0	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-4	G. B. P.	18	10	M	23	7,2	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-5	F. S.	23	20	M	178	10,1	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM1-6	F. S. F.	21	13	F	223	7,8	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-7	R. S. R.	29	3	M	59	11,1	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-8	J. C. S. T.	30	16	M	47	8,9	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-9	R. J. A.	21	5	M	66	9,0	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-10	C. L. B. P.	28	7	F	193	12,5	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-11	A. R. M.	29	3	M	225	9,8	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-12	M. M. J. C.	27	10	F	257	10,4	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-13	S. B. A.	37	7	F	82	8,4	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-14	C. S. K.	23	14	F	293	8,5	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-15	N. V. C.	22	13	F	143	8,3	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-16	K. B. C.	18	5	M	60	9,5	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-17	M. C. G. S.	25	6	F	85	10,5	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-18	J. S. O.	23	11	M	123	10,3	Sim	Não	Não	NA	NA
DM1-19	F. S. H. M.	25	8	M	162	7,7	Sim	Não	Não	NA	NA

ANEXO D

Identificação do paciente	Nome	Idade (anos)	Tempo de doença (anos)	Sexo	Glicemia (mg/dL)	Hb1Ac	Uso de insulina	Uso de metformina	Uso de outras medicações	Tempo de gestação	Número de gestações
DM2-1	M.J.P.S.	41	7	F	10,2	92	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM2-2	M.G.D.B.	51	14	F	10,2	219	Sim	Não	Sim	NA	NA
DM2-3	N.A.S.	56	24	F	12,0	295	Não	Sim	Sim	NA	NA
DM2-4	F.C.V.	66	9	M	9,4	183	Não	Sim	Sim	NA	NA
DM2-5	G.S.S.	61	24	F	7,8	101	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM2-6	M.A.N.M.	60	13	F	11,4	319	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM2-7	L.H.F.	43	8	F	10,7	173	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM2-8	M.A.R.T.	60	24	F	10,9	306	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM2-9	M.A.S.H.D	45	7	F	9,6	254	Não	Sim	Sim	NA	NA
DM2-10	J.D.S.	44	9	M	5,3	146	Não	Sim	Sim	NA	NA
DM2-11	S.O.B.L.	72	13	F	6,7	65	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM2-12	A.A.O.	62	19	M	7,0	109	Não	Sim	Sim	NA	NA
DM2-13	M.A.S.H.	49	11	F	7,1	117	Sim	Não	Sim	NA	NA
DM2-14	M.A.F.	47	14	F	5,8	92	Não	Sim	Sim	NA	NA
DM2-15	N.R.P	49	12	M	7,5	130	Sim	Não	Sim	NA	NA
DM2-16	R.V.	42	15	M	5,1	53	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM2-17	M.F.S.C.	45	13	F	8,2	81	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM2-18	N.R.	64	9	M	7,0	118	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM2-19	E.S.R.O.	47	7	F	9,4	237	Sim	Sim	Sim	NA	NA
DM2-20	J.D.P.	52	14	M	6,6	100	Não	Sim	Sim	NA	NA

ANEXO E

Identificação do paciente	Nome	Idade (anos)	Tempo de doença (anos)	Sexo	Glicemia (mg/dL)	Hb1Ac	Uso de insulina	Uso de metformina	Uso de outras medicações	Tempo de gestação (semanas)	Número de gestações
DMG-1	R. C. S.	35	NA	F	88	5,6	Não	Não	Não	30	1
DMG-2	R. M. G. S.	37	NA	F	86	7,9	Sim	Não	Não	25	1
DMG-3	M. M. M.	30	NA	F	67	5,1	Não	Não	Não	26	2
DMG-4	M. S. C.	40	NA	F	74	-----	Não	Não	Não	38	4
DMG-5	V. O. D.	35	NA	F	94	8,8	Não	Não	Não	27	1
DMG-6	J. C. F.	29	NA	F	65	5,7	Não	Não	Sim	34	1
DMG-7	R. S. S.	24	NA	F	74	5,4	Não	Não	Não	29	1
DMG-8	J. A. A.	23	NA	F	86	5,4	Não	Não	Sim	34	2
DMG-9	C. P. O..	33	NA	F	80	5,0	Não	Não	Sim	35	2
DMG-10	A. P. S. G.	29	NA	F	89	5,8	Sim	Não	Não	37	2
DMG-11	C. A. B.	37	NA	F	80	----	Não	Não	Não	37	4
DMG-12	M. C. P. G.	39	NA	F	72	5,7	Não	Não	Não	32	4
DMG-13	A. M. L.	29	NA	F	92	5,2	Sim	Não	Não	28	4
DMG-14	L. L. S. R.	30	NA	F	82	5,0	Não	Não	Não	34	3
DMG-15	Z. S. V.	33	NA	F	94	9,2	Sim	Não	Não	18	3
DMG-16	A. A. R.	38	NA	F	59	9,1	Sim	Não	Não	34	3
DMG-17	C. A. V	28	NA	F	81	6,1	Não	Não	Não	34	2

ANEXO F

Overall Results for sample 2 : **DMI-1**

RNA Area: 1,144.8
 RNA Concentration: 339 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 2 : **DMI-1**

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	41.18	42.71	220.3	19.2
28S	46.72	50.16	376.9	32.9

Overall Results for sample 5 : **DMI-2**

RNA Area: 1,201.8
 RNA Concentration: 356 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 5 : **DMI-2**

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.23	42.64	257.2	21.4
28S	46.73	49.91	396.1	33.0

Overall Results for sample 8 : **DMI-3**

RNA Area: 1,488.6
 RNA Concentration: 441 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 8 : **DMI-3**

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.93	42.40	292.7	19.7
28S	46.37	49.71	510.4	34.3

Overall Results for sample 9 : **DMI-4**

RNA Area: 1,093.2
 RNA Concentration: 324 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 9 : **DMI-4**

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.02	42.43	237.6	21.7
28S	46.33	49.79	376.3	34.4

Overall Results for sample 6 : **DMI-5**

RNA Area: 976.7
 RNA Concentration: 295 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.1 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.10

Fragment table for sample 6 : **DMI-5**

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.82	42.19	182.5	18.7
28S	46.72	49.33	300.8	30.8

Overall Results for sample 1 : **DMI-6**

RNA Area: 440.0
 RNA Concentration: 256 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 1 : **DMI-6**

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.40	42.80	84.8	19.3
28S	46.29	50.36	145.8	33.1

Overall Results for sample 3 : DMI-7

RNA Area: 470.5
 RNA Concentration: 274 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.07)
 Result Flagging Color: 9.4
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 3 : DMI-7

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.42	42.85	94.9	20.2
28S	46.29	50.34	162.6	34.6

Overall Results for sample 7 : DMI-8

RNA Area: 995.4
 RNA Concentration: 300 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.07)
 Result Flagging Color: 9.3
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 7 : DMI-8

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.97	42.19	200.8	20.2
28S	46.23	49.29	323.7	32.5

Overall Results for sample 6 : DMI-9

RNA Area: 1,217.9
 RNA Concentration: 361 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.07)
 Result Flagging Color: 9.3
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 6 : DMI-9

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	41.07	42.53	247.6	20.3
28S	47.13	50.09	401.0	32.9

Overall Results for sample 1 : DMI-10

RNA Area: 704.5
 RNA Concentration: 213 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (B.02.07)
 Result Flagging Color: 9.5
 Result Flagging Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 1 : DMI-10

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.05	42.45	150.1	21.3
28S	46.32	49.85	243.5	34.6

Overall Results for sample 2 : DMI-11

RNA Area: 452.5
 RNA Concentration: 263 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.07)
 Result Flagging Color: 9.4
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 2 : DMI-11

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.43	42.86	89.3	19.7
28S	46.38	50.33	152.8	33.8

Overall Results for sample 1 : DMI-12

RNA Area: 1,197.0
 RNA Concentration: 354 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.07)
 Result Flagging Color: 9.3
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 1 : DMI-12

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.29	42.69	247.2	20.7
28S	46.78	50.34	377.6	31.5

Overall Results for sample 2 : DMI-13

RNA Area: 919.0
RNA Concentration: 277 ng/ul
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 2 : DMI-13

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.98	42.47	200.0	21.8
28S	46.36	49.63	324.8	35.3

Overall Results for sample 3 : DMI-14

RNA Area: 841.5
RNA Concentration: 254 ng/ul
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 3 : DMI-14

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.98	42.32	185.7	22.1
28S	46.31	49.72	289.0	34.3

Overall Results for sample 4 : DMI-15

RNA Area: 811.9
RNA Concentration: 245 ng/ul
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 4 : DMI-15

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.97	42.32	172.0	21.2
28S	46.81	49.54	262.4	32.3

Overall Results for sample 8 : DMI-16

RNA Area: 845.0
RNA Concentration: 255 ng/ul
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 8 : DMI-16

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.85	42.22	171.0	20.2
28S	46.49	49.31	262.2	31.0

Overall Results for sample 9 : DMI-17

RNA Area: 875.2
RNA Concentration: 264 ng/ul
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 9 : DMI-17

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.92	42.26	174.9	20.0
28S	46.10	49.38	279.5	31.9

Overall Results for sample 10 : DMI-18

RNA Area: 726.7
RNA Concentration: 219 ng/ul
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 10 : DMI-18

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.92	42.21	148.0	20.4
28S	46.14	49.13	237.9	32.7

Overall Results for sample 11 : DMI-19

RNA Area: 900.3
RNA Concentration: 272 ng/ul
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 11 : DMI-19

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.87	42.11	182.4	20.3
28S	45.90	49.23	299.7	33.3

Overall Results for sample 1 : DM2-1

RNA Area: 506.0
 RNA Concentration: 435 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 1 : DM2-1

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	41.08	43.59	103.5	20.5
28S	48.05	51.33	154.4	30.5

Overall Results for sample 2 : DM2-2

RNA Area: 361.1
 RNA Concentration: 311 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 2 : DM2-2

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	41.05	43.52	73.4	20.3
28S	48.05	51.38	108.2	30.0

Overall Results for sample 3 : DM2-3

RNA Area: 516.6
 RNA Concentration: 444 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 3 : DM2-3

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.99	43.65	104.5	20.2
28S	47.21	51.62	166.9	32.3

Overall Results for sample 4 : DM2-4

RNA Area: 491.1
 RNA Concentration: 422 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.4
 RNA Integrity Number (RIN): 9.2 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.20

Fragment table for sample 4 : DM2-4

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.96	43.46	99.5	20.3
28S	48.04	51.17	139.6	28.4

Overall Results for sample 5 : DM2-5

RNA Area: 515.1
 RNA Concentration: 443 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.4
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 5 : DM2-5

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.93	43.40	101.9	19.8
28S	47.93	51.22	145.8	28.3

Overall Results for sample 6 : DM2-6

RNA Area: 476.6
 RNA Concentration: 410 ng/ul
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 6 : DM2-6

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.93	43.38	98.1	20.6
28S	47.17	51.24	149.2	31.3

Overall Results for sample 7 : DM2-7

RNA Area: 562.4
 RNA Concentration: 484 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.2 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.20

Fragment table for sample 7 : DM2-7

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.81	43.28	110.9	19.7
28S	47.56	50.96	164.2	29.2

Overall Results for sample 8 : DM2-8

RNA Area: 609.8
 RNA Concentration: 525 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.4
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 8 : DM2-8

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.72	43.16	125.3	20.5
28S	47.54	50.88	171.5	28.1

Overall Results for sample 9 : DM2-9

RNA Area: 478.0
 RNA Concentration: 411 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.4
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 9 : DM2-9

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.81	43.19	98.9	20.7
28S	47.52	51.18	140.1	29.3

Overall Results for sample 10 : DM2-10

RNA Area: 482.2
 RNA Concentration: 415 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 10 : DM2-10

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.79	43.18	97.5	20.2
28S	46.77	50.94	155.0	32.1

Overall Results for sample 11 : DM2-11

RNA Area: 517.7
 RNA Concentration: 445 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 11 : DM2-11

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.78	43.22	104.2	20.1
28S	47.64	51.04	151.8	29.3

Overall Results for sample 12 : DM2-12

RNA Area: 563.3
 RNA Concentration: 485 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (8.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 12 : DM2-12

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.71	43.19	110.0	19.5
28S	47.48	51.15	165.8	29.4

Overall Results for sample 1 : DM2-13

RNA Area: 254.3
RNA Concentration: 99 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 1 : DM2-13

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.91	43.34	46.4	18.2
28S	47.33	51.28	74.9	29.5

Overall Results for sample 2 : DM2-14

RNA Area: 507.8
RNA Concentration: 198 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 2 : DM2-14

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.90	43.30	94.9	18.7
28S	47.03	51.32	149.0	29.3

Overall Results for sample 3 : DM2-15

RNA Area: 525.6
RNA Concentration: 205 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 3 : DM2-15

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.96	43.35	112.1	21.3
28S	47.08	51.10	178.1	33.9

Overall Results for sample 4 : DM2-16

RNA Area: 412.6
RNA Concentration: 161 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.3
RNA Integrity Number (RIN): 8.6 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 8.60

Fragment table for sample 4 : DM2-16

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.72	43.38	76.4	18.5
28S	46.95	51.09	99.3	24.1

Overall Results for sample 5 : DM2-17

RNA Area: 482.7
RNA Concentration: 188 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
RNA Integrity Number (RIN): 9.2 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.20

Fragment table for sample 5 : DM2-17

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.74	43.23	90.5	18.7
28S	47.49	50.89	139.8	29.0

Overall Results for sample 6 : DM2-18

RNA Area: 520.5
RNA Concentration: 203 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9

Fragment table for sample 6 : DM2-18

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.70	43.17	96.1	18.5
28S	46.93	51.13	150.5	28.9

Overall Results for sample 7 : DM2-19

RNA Area: 531.1
RNA Concentration: 207 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 7 : DM2-19

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.59	43.01	105.5	19.9
28S	47.38	50.72	155.1	29.2

Overall Results for sample 8 : DM2-20

RNA Area: 819.1
RNA Concentration: 335 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 8.5 (8.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 8.50

Fragment table for sample 8 : DM2-20

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.07	42.31	131.4	16.0
28S	45.60	49.58	210.7	25.7

Overall Results for sample 2 : DMG-1

RNA Area: 434.4
RNA Concentration: 130 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.4
RNA Integrity Number (RIN): 9 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9

Fragment table for sample 2 : DMG-1

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.03	42.15	84.7	19.5
28S	46.45	49.20	115.2	26.5

Overall Results for sample 3 : DMG-2

RNA Area: 2,346.8
RNA Concentration: 700 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.3
RNA Integrity Number (RIN): 8.8 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 8.80

Fragment table for sample 3 : DMG-2

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.92	42.05	430.8	18.4
28S	46.21	49.35	570.0	24.3

Overall Results for sample 4 : DMG-3

RNA Area: 520.5
RNA Concentration: 155 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
RNA Integrity Number (RIN): 9.6 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.60

Fragment table for sample 4 : DMG-3

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.01	42.19	116.8	22.4
28S	46.21	49.36	180.1	34.6

Overall Results for sample 5 : DMG-4

RNA Area: 1,397.2
RNA Concentration: 417 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 5 : DMG-4

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.89	42.18	284.8	20.4
28S	46.12	49.29	420.6	30.1

Overall Results for sample 7 : DMG-5

RNA Area: 621.0
RNA Concentration: 185 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
RNA Integrity Number (RIN): 9.6 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.60

Fragment table for sample 7 : DMG-5

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.80	42.16	126.7	20.4
28S	45.98	49.26	212.8	34.3

Overall Results for sample 8 : DMG-6

RNA Area: 609.0
RNA Concentration: 182 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9.8 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.80

Fragment table for sample 8 : DMG-6

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.89	42.10	129.9	21.3
28S	45.98	49.18	214.1	35.2

Overall Results for sample 9 : DMG-7

RNA Area: 742.1
 RNA Concentration: 221 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.8
 RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 9 : DMG-7

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.66	42.14	142.2	19.2
28S	46.04	49.19	260.0	35.0

Overall Results for sample 10 : DMG-8

RNA Area: 504.0
 RNA Concentration: 150 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9

Fragment table for sample 10 : DMG-8

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.77	42.09	91.9	18.2
28S	45.39	49.14	141.0	28.0

Overall Results for sample 11 : DMG-9

RNA Area: 387.8
 RNA Concentration: 116 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.2
 RNA Integrity Number (RIN): 8.4 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 8.40

Fragment table for sample 11 : DMG-9

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.68	42.00	65.2	16.8
28S	46.08	49.04	80.6	20.8

Overall Results for sample 1 : DMG-10

RNA Area: 461.9
 RNA Concentration: 169 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 1 : DMG-10

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.97	42.31	86.7	18.8
28S	45.75	49.53	140.0	30.3

Overall Results for sample 2 : DMG-11

RNA Area: 453.2
 RNA Concentration: 165 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 2 : DMG-11

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.09	42.32	88.8	19.6
28S	45.64	49.66	146.2	32.3

Overall Results for sample 4 : DMG-12

RNA Area: 479.0
 RNA Concentration: 175 ng/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.07)
 Result Flagging Color:
 Result Flagging Label: RIN: 9.40

Fragment table for sample 4 : DMG-12

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.92	42.21	94.8	19.8
28S	45.60	49.73	157.9	33.0

Overall Results for sample 5 : DMG-13

RNA Area: 511.2
RNA Concentration: 186 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
RNA Integrity Number (RIN): 8.9 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 8.90

Fragment table for sample 5 : DMG-13

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	40.05	42.25	87.1	17.0
28S	45.60	49.45	143.9	28.2

Overall Results for sample 7 : DMG-14

RNA Area: 549.3
RNA Concentration: 200 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
RNA Integrity Number (RIN): 9.1 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.10

Fragment table for sample 7 : DMG-14

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.96	42.17	99.5	18.1
28S	45.45	49.59	163.2	29.7

Overall Results for sample 8 : DMG-15

RNA Area: 503.4
RNA Concentration: 184 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
RNA Integrity Number (RIN): 9.1 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9.10

Fragment table for sample 8 : DMG-15

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.84	42.12	91.8	18.2
28S	45.35	49.25	154.7	30.7

Overall Results for sample 9 : DMG-16

RNA Area: 1,033.4
RNA Concentration: 377 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
RNA Integrity Number (RIN): 9 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 9

Fragment table for sample 9 : DMG-16

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.87	42.05	189.2	18.3
28S	45.86	49.22	285.4	27.6

Overall Results for sample 10 : DMG-17

RNA Area: 650.4
RNA Concentration: 237 ng/μl
rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
RNA Integrity Number (RIN): 8.8 (B.02.07)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 8.80

Fragment table for sample 10 : DMG-17

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.91	42.10	114.3	17.6
28S	46.07	49.12	174.7	26.9

ANEXO G

QC Report - Agilent Technologies : 1 Color Gene Expression

Date	Thursday, July 22, 2010 - 11:57	Grid	014850_D_20070207
Image	US09523754_251485055227_S01_H [1_1]	BG Method	No Background
Protocol	GE1_107_Sep09 (Read Only)	Background Detrend	On(FeatNCRRange, LoPass)
User Name	Administrator	Multiplicative Detrend	True
FE Version	10.7.1.1	Additive Error	5(Green)
Sample(red/green)		Saturation Value	632794 (g)

Spot Finding of the Four Corners of the Array

Grid Normal

Feature	Local Background
Green	Green

Non Uniform	22	18
Population	159	777

Spatial Distribution of All Outliers on the Array

532 rows x 85 columns

FeatureNonUnif (Green) = 22(0.05%)

GeneNonUnif (Green) = 18 (0.044 %)

● BG NonUniform ● BG Population
● Green FeaturePopulation ● Green Feature NonUniform

Net Signal Statistics

Agilent SpikeIns:

Green

# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	524986
50% of Sig. Distrib.	1993
1% of Sig. Distrib.	70

Non-Control probes:

Green

# Saturated Features	0
99% of Sig. Distrib.	145815
50% of Sig. Distrib.	313
1% of Sig. Distrib.	53

Histogram of Signals Plot

Features (NonCtrl) with BGSubSignal < 0: 3004 (Green)

Tipo de célula do sistema imunológico (ImmGen)			Genes							
B1a	ADM	ALDH2	B3GNT5	BANK1	BCAR3	BCL11A	BLK	BLNK	BTK	
		C11orf53	C13orf18		CACNA1E		CACNA1I			
		CAPG	CCR1	CD180	CD19	CD22	CD300LF		CD38	
		CD74	CD79A	CD79B	CD80	CDH17	CECR2	CHST3	CIITA	
		CSF2RB	CTSH	CXCR5	CYBASC3		CYBB	CYP4F3	DENND5B	
		DMXL2	DNASE1L3		DOK3	EBF1	ERO1LB		FAIM3	
		FCGR2B		FCRL3	FCRLA	FGD2	FGD6	FZD6	GIMAP4	
		HCK	HEPACAM2		HLA-DMB		HLA-DOB		HLA-DQA1	
		HLA-DQB1		HLA-DRB1		IFI30	IGHMBP2		IL5RA	
		IRF4	IRF5	KRT222P		KYNU	LAT2	LMO7	LPGAT1	
		LY6D	LY86	LYN	MCOLN2		MEF2C	MGC29506		
		MPEG1	MS4A1	MTSS1	MYADM		MYO1E	NAIP	NAIP	
		NAPSA	NCF1	NID1	NLRC4	PAX5	PDE8A	PGAP1	PIK3C2B	
		PKIG	PLAC8	PLAUR	PLD4	PLEK	PLSCR1	POU2AF1		
		PRR5	PSTPIP2		PTPRJ	RAB30	RALGPS2		RASSF4	
		RBM47	RDH12	RNASE6S1	PR1	SCD	SH3BP5	SIGLEC10		
		SIRPA	SLC7A7	SNN	SP1B	SSPN	ST8SIA6	SWAP70	SYK	
		TLR7	TLR9	TMEM154		TMEM163		TNFRSF13B		
		TRIM7	TXNDC16		UNC93B1		XKRX	ZBTB20	ZBTB32	
	B1b	AHNAK	AICDA	ALDH2	ANGPTL1		APOBEC1		ATRN1	B3GNT5
		BANK1	BCAR3	BCL11A	BLK	BLNK	BTK	C13orf18		
		C13orf31		C9orf85	CACNA1E		CACNA1I		CAPG	
		CCR6	CD180	CD19	CD22	CD36	CD38	CD74	CD79A	
		CD79B	CD80	CDH17	CECR2	CHST3	CIITA	CR2	CSF2RB	
		CTSH	CXCR5	CYBASC3		CYBB	CYP4F3	DENND4A		
		DENND5B		DIRAS2	DNASE1L3		DOK3	EBF1	EMR1	
		ENPP1	ERO1LB		EVI5	FAIM3	FBXW12		FCGR2B	
		FCRL1	FCRL3	FCRLA	FFAR1	FGD2	FGL2	FRY	GAS7	
		GBP4	GGA2	GIMAP4		GRAMD2		HCK	HEPACAM2	
		HLA-DMB		HLA-DOB		HLA-DQA1		HLA-DQB1		
		HLA-DRB1		IFI30	IGHMBP2		IL18	IL5RA	IL9R	
		IRAK3	IRF4	IRF5	ITGAM	KIAA0226		KMO	KRT222P	
		KYNU	LAT2	LIFR	LMO7	LPGAT1		LRRK2	LY6D	
		LY86	LYN	MAP4K5		MCOLN2		MEF2C	MGC29506	
		MPEG1	MS4A1	MTSS1	MYADM		MYO1C	MYO1E	NAAA	
		NAIP	NAIP	NAPSA	NCF1	NEUROD4		NFAM1	NID1	
		NLRC4	NUAK2	PAX5	PDCD1L	LG2	PDE8A	PGAP1	PIK3C2B	
		PKIG	PLAC8	PLAUR	PLD4	PLEK	PLEKHM3		PLSCR1	
		POU2AF1		POU2F2		PPL	PRKAR2B		PTPRJ	
		RAB30	RAB31	RALGPS2		RASGRP3		RASSF4	RDH12	
		RNASE6S1	00A4	S100A6	S1PR1	SCD	SCPEP1	SERPINB1		
		SETBP1	SH3BP5	SIGLEC10		SIRPA	SLAMF9		SLC16A7	
		SLC37A2		SNX2	SNX8	SOX5	SP140	SP1B	SRPK3	
		STAC2	SYK	TLR4	TLR7	TLR9	TMEFF1		TMEM154	
		TMEM163		TNFRSF8		TPPP	TPPP3	TRIM7	TUBB6	
		TXNDC16		UNC93B1		YPEL2		ZBTB32		
Linfócito B folicular		ANGPTL1		ATP6V0A1		B3GNT5		BANK1	BCAR3	BCL11A
			BCL6	BLK	BLNK	BMP2K	BTK	BTLA	C13orf18	
		C6orf145		C7orf23	CACNA1E		CACNA1I		CCR6	
		CD180	CD19	CD200	CD22	CD36	CD38	CD40	CD72	
		CD74	CD79A	CD79B	CD83	CHST3	CIITA	CNR2	CPM	
		CTSH	CXCR5	CYBASC3		CYBB	CYP4F3	DENND5B		
		DOK3	EBF1	ENPP1	ERO1LB		FAIM3	FCER2	FCGR2B	

	FCHSD2	FCRL1	FCRLA	FFAR1	GGA2	GPR174	HAAO
	HCK	HHEX	HLA-DMA	HLA-DMB	HLA-DOA		
	HLA-DOB	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DRB1			
	HVCN1	ICOSLGIF130	IGHMBP2	IL4I1	IL5RA	IL9R	
	IRAK3	IRF5	IRF8	KIAA0226	KMO	KYNU	LAT2
	LMBRD1	LMO2	LRRK2	LY6D	LY86	LYN	MAPK11
	MEF2C	MS4A1	MYO1E	NCF1	NLRC4	NUAK2	PAX5
	PIK3AP1	PIK3C2B	PLAUR	PLD4	PLEK	PLEKHM3	
	POU2AF1	PRKCE	PXK	RAB30	RALGPS2	RAPGEF4	
	RASGEF1B	RASGRP3	RDH12	RNASE6	S1PR1	SCD	
	SELL	SERPINB1	SETBP1	SH3BP5	SIGLEC10	SLC9A7	SNN
	SNX2	SNX29	SNX30	SNX8	SORL1	SPIB	SRPK3
	SWAP70	SYK	TEC	TLR1	TLR4	TLR9	TNFRSF13C
	TRIM7	TXNDC16	UNC93B1	XKRX	YSK4	ZNF318	
	ZNF608						
	ABCB1	ARHGAP24	ASB2	B3GNT5	BANK1	BCAR3	BCL11A
	BLNK	BMP2K	BTK	BTLA	C13orf18	C1orf162	
	C1orf38	C1orf54	C2orf34	C6orf145	C7orf23	CACNA1E	
	CAPG	CCBP2	CCDC79	CCR1	CCR6	CD180	CD19
	CD1D	CD22	CD300LF	CD36	CD38	CD40	CD72
	CD74	CD79A	CD79B	CD86	CDH17	CEACAM21	CFP
	CHST3	CIITA	CNR2	CR2	CREBL2	CSF2RB	CTSH
	CXCR5	CYBASC3	CYBB	CYP39A1	CYP4F3	DENND5B	
	DNASE1L3	DOK3	DPH5	DTX1	DUSP16	EBF1	
	EDARADD	ELL3	ERO1LB	FAIM3	FCER2	FCGR2B	
	FCRL1	FCRL3	FCRLA	FFAR1	FFAR2	FGD2	GGA2
	HCK	HES1	HLA-DMA	HLA-DMB	HLA-DOA		
	HLA-DOB	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DRB1			
	HPSE	ICOSLGIF130	IGHMBP2	IL4I1	IL5RA	IL9R	
	INPP5F	IRAK3	IRF4	IRF5	KCNK5	KIAA0226	KMO
	KYNU	LAT2	LAX1	LGMN	LPCAT2	LRRK16A	LRRK2
	LY6D	LY86	LYN	LYNX1	MARCKS	MEF2C	MFHAS1
	MGC29506	MPEG1	MS4A1	MYO1E	NAIP	NAIP	NAPSA
	NCF1	NLRC4	NOTCH2	NUCB2	PAX5	PDIA4	PGAP1
	PIK3C2B	PIK3R4	PLA2G7	PLAC8	PLAUR	PLD4	PLEK
	PLEKHM3	PLXNC1	POU2AF1	PQLC2	PTPN14		
	PTPRJ	RAB30	RALGPS2	RASGEF1B	RASGRP3		
	RGS18	RNASE6	S1PR1	S1PR3	SCD	SDC4	SEMA4B
	SEMA7A	SERPINB1	SERPINE2	SIGLEC10			
	SLC15A4	SLC37A2	SLC41A2	SLC9A7	SNN		
	SPIB	SWAP70	SYK	TLR1	TLR3	TLR4	TLR7
	TLR9	TMEM77	TNFRSF13B	TNFRSF13C	TRIM7		
	TSGA13	TSPAN15	TXNDC16	UNC93B1	XKRX		
	ZC3H12C						
	BCL11B	CAMK4	CCR4	CCR8	CD226	CD247	CD28
	CD3G	CD4	CD40LG	CD5	CD6	CTLA4	CXCR3
	CXCR5	DAPL1	GIMAP4	HMP19	ICOS	IFT80	IL2RB
	INPP4B	ITK	LAT	LOC390243	MAF	MS4A6A	
	NRN1	NRP1	NT5E	PDCD1	PRKCQ	S1PR1	SH2D1A
	SH2D2A	SIDT1	SKAP1	SLFN13	SNTB1	STK39	SYT11
	THY1	TNFSF8	TRAT1	TXK	ZAP70		
	BCL11B	CAMK4	CD247	CD28	CD3D	CD3E	CD3G
	CD5	CD6	DAPL1	GALNT6	GIMAP4	HMP19	
	IGFBP4	IKBKE	IL6R	INPP4B	ITK	ITM2A	KBTBD11
	LOC390243	LYPD6B	MS4A6A	PRKCQ	RAPGEF4		
	S1PR1	SIDT1	SKAP1	SLFN13	ST8SIA6	TCF7	TGFBR3
	THY1	TNFSF8	TRAT1	TRIB2	TXK	VIPR1	ZAP70
	BTBD11	C17orf28	C8orf42	CAMK4	CCL5	CCR5	CD226
	CD3D	CD3E	CD3G	CD5	CD6	CD8A	CD8B
	CRTAM	CST7	CTSW	CXCR3	CXCR6	DAPL1	EHD3
							EOMES

Linfócito B de zona marginal

CD4 memória

CD4 naive

CD8 memória

	F2RL1	GIMAP4	GPR114	HMP19	IL18R1	IL18RAP		
	IL2RB	ITK	ITM2A	KLRD1	MS4A6A	MYO1F	NKG7	
	PDE2A	PRF1	PRKCQ	S1PR1	SAMD3	SH2D2A	SIDT1	
	SKAP1	SLFN13	TBX21	THY1	TNFSF8	TXK	ZAP70	
CD8 naive	BTBD11	C17orf28	C8orf42	CAMK4	CCR9	CD226	CD3D	CD3E
	CD3G	CD6	CD7	CD8A	CD8B	CRTAM	CST7	CTSW
	CXCR6	DAPL1	GALNT6	GGT1	GPR114	GPR68	HMP19	
	IGFBP4	IKBKE	IL2RB	ITGAE	ITK	KLRD1	LAT	MS4A6A
	NKG7	PRF1	PRKCQ	RAPGEF4	S1PR1	SIDT1	SKAP1	
	SLC12A7	SLC16A5	SLC6A19	SLFN13	TCF7			
	THY1	TXK	ZAP70					
	ADRBK2	AIF1	ALOX5AP	ALPK1	ANPEP	ANXA4	APP	
Célula dendrítica	ARRDC4	ASAHI	ATF3	AXL	C13orf31	C17orf87		
	C1orf38	CCDC88A	CCND1	CCR5	CD180	CD300C		
	CD36	CD68	CD74	CD80	CD83	CD86	CIITA	CLEC12A
	CLEC7A	CLEC9A	CMTM3	CSF2RBC	CSF2RBC	CSF2RBC	CSF2RBC	CSF2RBC
	CTNND1	CTSH	CXCL16	CYP27A1	CYSLTR1			
	DAB2	DAPK1	DNASE1L3	DOCK7	DUSP1	ENTPD1		
	F11R	FCER1G	FCGR2B	FGL2	FLJ78302			
	FLT3	FMNL2	FOS	FOSB	FRMD4B	GATM	HCK	
	HLA-DMA	HLA-DMB	HLA-DQA1	HLA-DQB1				
	HLA-DRB1	ID2	IFI30	IL13RA1	IL1A	IL1B		
	IRF5	ITGA1	ITGA8	ITGAX	JUN	KIAA1598	KIT	
	LGALS3	LPCAT2	LY86	MED7	MET	MOSPD2	MPEG1	
	MYADM	MYO1F	NAAA	NAIP	NAIP	NFAM1	NOSTRIN	
	NRP1	OLFM1	P2RY6	PAK1	PFTK1	PID1	PIK3CB	PLD4
	PLEK	PPAP2A	RAB32	RASGEF1B	RASSF4	RBM47		
	RGS1	RGS2	RNASE6	SDC3	SH3PXD2B	SLAMF8		
	SPI1	ST3GAL5	STOM	SULF2	TBC1D8	TBXAS1	TF	
	TGFBI	TIFAB	TLR9	TREML4	TRIB1	TUBB6	TYROBP	
	UNC93B1							
Célula iNKT	CAMK4	CAPG	CCR8	CD226	CD28	CD3D	CD3E	CD3G
	CD40LG		CD6	CST7	CTSW	CXCR3	CXCR6	GATA3
	GPMBICOS	ID2	IL18R1	IL18RAP	IL2RB	INPP4B		
	ITGAE	ITK	LOC390243	NT5E	PDCD1	PRKCQ	RAVER2	
	SKAP1	SLFN13	STK39	TBX21	THY1	TMEM154	TRPM6	
	TTC39C	CTXK	ZAP70	ZBTB16				
Macrófago	ABCC5	ABCD2	ABCG1	ABHD12	ABHD3	ABHD5	ACP2	ACSL1
	ADAM22	ADAM9	ADARB1	ADCY3	ADIPOR2			
	ADRB2	AGPAT9	ALAS1	ALDH3B1	ALDOC	ALOX5		
	ALOX5AP	ANG	ANGPTL4	ANLN	ANXA1	ANXA2		
	ANXA3	ANXA4	ANXA5	APLP2	APP	ARHGAP24	ARRDC4	
	ASAHI	ASPH	ATF3	ATG4C	ATP10A	ATP13A3	ATP6V0A1	
	ATP6V0D2	ATXN1	AXL	BCAR3	BCL2A1	BCL2A1	BCL2A1	
	BEST1	BLVRA	BMPR2	BMX	BST1	C10orf11	C10orf128	
	C17orf87	C19orf59	C1orf162	C1orf38	C1R			
	C20orf177	C3	C5AR1	C7orf58	C8orf4	C9orf98	CA4	
	CA5B	CAMK1	CAPG	CAPN2	CASK	CASP1	CAV1	CAV2
	CCDC109B	CCDC80	CCDC88A	CCL3L3	CCR1			
	CCRL2	CD14	CD200R1	CD200R2	CD22	CD300C		
	CD300LF	CD302	CD36	CD44	CD63	CD68	CD80	CD9
	CD93	CDC42BPB	CDC42EP3	CDGAP	CDH1	CDKN1A		
	CEBPA	CEBPB	CFB	CFP	CH25H	CIB2	CIDEC	CLDN1
	CLEC12A	CLEC1B	CLEC4A	CLEC4D				
	CLEC5A	CLEC6A	CLEC7A	CLMN	CNDP2			
	COMT	CORO6	CPD	CPNE5	CPNE8	CREG1	CSF1R	CSF2RB
	CSF2RBCSTB	CTNND1	CTSB	CTSC	CTSD	CTSH		
	CTSK	CTSL2	CTSS	CTSZ	CTTNBP2NL	CXCL3	CXorf57	
	CYBASC3	CYBB	CYFIP1	CYP4F3	DAAM1	DAB2	DAPK1	DBI
	DEPDC6	DGAT2	DGKG	DHRS3	DIP2C	DMXL2	DNA2	

	DNAH11	DNASE1L1	DOCK1	DOCK4	DOCK5	DOCK7	
	DOK3	DPEP2	DPP7	DSE	DSTN	DSTN	DUSP1
	EEPD1	EGR2	EMP1	EMR1	ENPP1	ENTPD1	EVI5
	F11R	F7	FABP1	FABP4	FABP5	FBXO30	F10
	FCGR1A		FCGR2A		FCGR2B		FCER1G
	FGD4	FGR	FLT1	FN1	FNDC3B	FOS	FOSB
	FOSL2	FPR1	FPR3	FRMD4A	FTL	FZD4	GAB2
	GADD45G		GAL	GALNT3	GBGT1	GCA	GCNT2
	GDA	GLA	GLUL	GMPR	GNS	GPNMBGPR120	GPR141
	GPR155	GRK5	GSR	GSTM5	GSTO1	GYG1	HCK
	HEXA	HGF	HIP1	HLA-DMA	HMOX1	HTR2C	IDH1
	IFI30	IGSF6	IL13RA1		IL18	IL1A	IL1B
	IL1RN	ITGAX	ITGB5	ITPRIPL2		JAG1	JUN
	KCNE3	KCNN3	KIAA1211		KIAA1274		KIAA1598
	KLF10	KLF4	KLRA1	KRT79	KYNU	LAIR1	LAMP2
	LEPR	LGALS3	LGMN	LHFPL2		LIMA1	LIPA
	LMNA	LONRF3		LPHN2	LPHN3	LPIN1	LPL
	LRP12	LTC4S	LY75	LY86	LYPLAL1		MAK
	MAN1C1		MAOA	MAP7D3		MARCOMARVELD2	
	MATN2	MCAM	MCOLN3		MED7	MEGF9	MERTK
	MGLL	MGST1	MITF	MMP19	MMP8	MOBK2B	MOSPD2
	MPEG1	MRC1L1		MS4A8B		MSR1	MT1E
	MTM1	MTMR10		MTMR7	MYADM		MYO1E
	MYO6	MYO7A	NAAA	NAIP	NAIP	NCF1	NCOA4
	NET1	NFAM1	NFIL3	NLN	NLRC4	NLRP3	NOSTRIN
	NRG4	NRP1	NRP2	NT5E	NUAK2	NUCB2	NXT2
	OLR1	OSM	P2RY13	P2RY14	P2RY2	P2RY6	PBX1
	PDE8A	PDGFC	PDK4	PERP	PEX11A	PFTK1	PGAP1
	PID1	PIK3AP1		PIK3R6	PILRA	PILRB	PILRB
	PLA2G4A		PLAUR	PLCB1	PLD1	PLD3	PLD4
	PLEKHG1		PLK3	PLOD3	PLSCR1	PLTP	PLXDC2
	PNPLA8		PON2	PON3	PPARG	PQLC3	PRDM1
	PRKAR2B		PROM1	PROS1	PSTPIP2		PTGER2
	PTGFRN		PTPLAD2		PTPN12	PYGL	RAB31
	RALB	RASGEF1B		RASSF4	RBM47	REEP5	RENPB
	RGL1	RGS1	RGS2	RHOB	RHOC	RIN2	RNASE2
	RND3	RNF144B		RNF180	RNF217	RNH1	RUFY4
	S100A1	SAT1	SCARB2	SCGB1A1		SDC3	SEC14L2
	SEMA3E		SEMA6D		SEPP1	SEPX1	SERPINB1
	SERPINB6		SERPINE1		SFTPC	SGK1	SGMS2
	SH3BGRL2		SH3PXD2B		SH3TC1	SIGLEC1	SIGLEC12
	SIGLEC7		SIRPA	SIRPB1	SLAMF9		SLC15A3
	SLC16A7		SLC25A24		SLC35F5		SLC36A4
	SLC39A2		SLC6A4	SLC7A2	SLC7A7	SLC7A8	SLC9A2
	SLCO2B1		SLPI	SMPDL3B		SNX10	SNX24
	SORT1	SPII	SPINT1	SPIRE1	SPP1	SQRDL	ST7
	SULF2	SYNE2	TAX1BP3		TBXAS1	TC2N	TCF7L2
	TFEC	TGFBI	TGFBR1		TGM2	THBD	TIFAB
	TLR4	TLR7	TLR8	TMBIM1		TMCC3	TMEM106A
	TMEM154		TNFAIP2		TNFRSF21		TNFSF12
	TNS1	TPPP3	TREM1	TREML4		TTYH2	TUBB6
	UCP3	UNC119		VAT1	VSTM2A		WDFY3
	ZFAND2A						ZEB2
	BCL11B	CAMK4	CAPG	CCR4	CCR8	CD200R1	CD226
	CD28	CD3D	CD3E	CD3G	CD4	CD5	CD6
	CST7	CTLA4	CXCR3	CXCR5	ECM1	EPHX1	LOC390243
	FOXP3	GATA3	GBP4	GDPD3	GIMAP4		GIMAP7
	GPR83	ICOS	IFT80	IKBKE	IKZF2	IL2RA	IL2RB
	ITGA6	ITGAE	ITGB8	ITIH5	ITK	ITM2A	KBTBD11
	KLRG1	LAMC1	LAT	LRIG1	LRRC32	MS4A6A	MYO1E
							NEB

Célula T regulatória

	<i>NRN1</i>	<i>NRP1</i>	<i>HMP19</i>	<i>NT5E</i>	<i>P2RX7</i>	<i>PRKCQ</i>	<i>PTPN13</i>	<i>RGS1</i>	
	<i>S1PR1</i>	<i>SH2D2A</i>		<i>SIDT1</i>	<i>SKAP1</i>	<i>SLC35D1</i>		<i>SLFN13</i>	<i>SP6</i>
	<i>SYT11</i>	<i>SYTL2</i>	<i>TBC1D30</i>		<i>THY1</i>	<i>TNFRSF18</i>		<i>TNFRSF4</i>	
	<i>TNFRSF9</i>		<i>TNIK</i>	<i>TXK</i>	<i>ZAP70</i>	<i>ZDHHC2</i>			

Categoria do GWAS integrator	Genes									
DM1	<i>ABO</i>	<i>ADAD1</i>	<i>ADIPOQ</i>	<i>AFF3</i>	<i>ARL15</i>	<i>ATP10A</i>	<i>ATP8B1</i>	<i>ATXN2</i>		
		<i>BACH2</i>	<i>C12orf30</i>		<i>C16orf75</i>		<i>C1QTNF6</i>		<i>C6orf173</i>	
		<i>CAPSL</i>	<i>CCR1</i>	<i>CCR3</i>	<i>CD226</i>	<i>CD69</i>	<i>CDK2</i>	<i>CLEC16A</i>		
		<i>COBL</i>	<i>CTLA4</i>	<i>CTSH</i>	<i>ERBB3</i>	<i>FAD1</i>	<i>G6PC2</i>	<i>GCK</i>	<i>GLIS3</i>	
		<i>HHEX</i>	<i>HK1</i>	<i>HLA</i>	<i>HLA-B</i>	<i>HLA-E</i>	<i>HUNK</i>	<i>IFIH1</i>	<i>IKZF4</i>	<i>IL10</i>
		<i>IL12A</i>	<i>IL18R1</i>	<i>IL18RAP</i>		<i>IL1RL1</i>	<i>IL2</i>	<i>IL21</i>	<i>IL27</i>	
		<i>IL2RA</i>	<i>IL7R</i>	<i>INS</i>	<i>KCNK12</i>		<i>KCNQ1</i>	<i>KIAA1109</i>		
		<i>LASS4</i>	<i>LOC150577</i>	<i>LPAR3</i>	<i>LPP</i>	<i>NR</i>	<i>ORMDL3</i>			
		<i>PGM1</i>	<i>PHTF1</i>	<i>PRKCQ</i>	<i>PRM3</i>	<i>PTPN2</i>	<i>PTPN22</i>	<i>RAB5B</i>	<i>RASGRP1</i>	
		<i>RGS1</i>	<i>RNLS</i>	<i>SCHIP1</i>	<i>SGPP1</i>	<i>SH2B3</i>	<i>SLC30A8</i>		<i>SLC9A4</i>	
		<i>SMOC2</i>	<i>SPTLC3</i>	<i>SUOX</i>	<i>TAGAP</i>	<i>TCF7L2</i>	<i>TNP2</i>	<i>UBASH3A</i>		
	<i>ADAM30</i>		<i>ADAMTS9</i>	<i>ADCY5</i>	<i>ADIPOQ</i>		<i>ADRA2A</i>			
		<i>AIF1</i>	<i>APOB</i>	<i>APOE</i>	<i>APOEcluster</i>	<i>ARAP1</i>	<i>ARL15</i>	<i>ATP10D</i>		
		<i>ATP2A1</i>	<i>ATP8B1</i>	<i>BCDIN3D</i>		<i>BCL11A</i>	<i>ABCO2</i>	<i>BDNF</i>	<i>C11orf10</i>	
DM2		<i>C2CD4A</i>		<i>C2CD4B</i>		<i>CAMK1D</i>		<i>CCNL1</i>	<i>CDC123</i>	
		<i>CDKAL</i>	<i>CDKAL1</i>		<i>CDKN2A</i>		<i>CDKN2B</i>		<i>CETN3</i>	
		<i>CETP</i>	<i>CHCHD9</i>		<i>CHST8</i>	<i>CPVL</i>	<i>CRP</i>	<i>CRTAC1</i>		
		<i>CRY2</i>	<i>DCD</i>	<i>DGKB</i>	<i>DGKG</i>	<i>DUSP9</i>	<i>DYRK1A</i>		<i>ELMO1</i>	
		<i>ENG</i>	<i>ERCC4</i>	<i>ETV5</i>	<i>FAD1</i>	<i>FADS1</i>	<i>FADS2</i>	<i>FAIM2</i>	<i>FLJ41733</i>	
		<i>FTO</i>	<i>G6PC2</i>	<i>GCK</i>	<i>GCKR</i>	<i>GIPR</i>	<i>GIT2</i>	<i>GLIS3</i>	<i>GLTP</i>	
		<i>HERPUD1</i>		<i>HHEX</i>	<i>HK1</i>	<i>HMGA2</i>	<i>HNF1A</i>	<i>HNF1B</i>	<i>HUNK</i>	<i>IDE</i>
		<i>IGF1</i>	<i>IGF2BP2</i>		<i>IL6R</i>	<i>IRS1</i>	<i>ITGB6</i>	<i>JAZF1</i>	<i>KCNJ11</i>	
		<i>KCNK12</i>		<i>KCNQ1</i>	<i>KCTD15</i>		<i>KLF14</i>	<i>LASS4</i>	<i>LEKR1</i>	
		<i>LEPR</i>	<i>LGR5</i>	<i>LOC64673</i>		<i>LOC72901</i>		<i>LPL</i>	<i>MADD</i>	
		<i>MC4R</i>	<i>MTNR1B</i>		<i>NCR3</i>	<i>NEGR1</i>	<i>NOTCH2</i>		<i>NR</i>	
		<i>PKMYT1</i>		<i>PMAIP1</i>	<i>PPARG</i>	<i>PPP2R2C</i>		<i>PRC1</i>	<i>PRDM5</i>	
		<i>PROX1</i>	<i>PTPRD</i>	<i>PVT1</i>	<i>RASAL2</i>	<i>RBMS1</i>	<i>SEC16B</i>	<i>SGPP1</i>	<i>SH2B1</i>	
		<i>SLC2A2</i>	<i>SLC30A8</i>		<i>SMOC2</i>	<i>SPRY2</i>	<i>SPTLC3</i>	<i>SRR</i>	<i>STOML3</i>	
		<i>SYN2</i>	<i>TCF7L2</i>	<i>THADA</i>	<i>TMEFF2</i>		<i>TMEM18</i>		<i>TMEM195</i>	
		<i>TP53INP1</i>		<i>TRA2B</i>	<i>TSPAN8</i>	<i>VEGFA</i>	<i>VPS13C</i>	<i>WFS1</i>	<i>ZBED3</i>	
		<i>ZFAND6</i>		<i>ZMAT4</i>	<i>ZNF644</i>					

Categoria do Phenopedia	Genes									
Angiopatia	<i>ABCC8</i>	<i>ACE</i>	<i>ADD1</i>	<i>ADH1B</i>	<i>ADIPOQ</i>		<i>ADRB1</i>	<i>ADRB3</i>	<i>AGER</i>	<i>AGT</i>
		<i>AGTR1</i>	<i>AGTR2</i>	<i>AHSG</i>	<i>AKR1B1</i>	<i>AKR1B10</i>		<i>ALDH2</i>	<i>APOA1</i>	
		<i>APOA4</i>	<i>APOC3</i>	<i>APOE</i>	<i>AR</i>	<i>CA1</i>	<i>CAPN10</i>		<i>CAT</i>	
		<i>CCL2</i>	<i>CCL5</i>	<i>CCR5</i>	<i>CD40</i>	<i>CD40LG</i>		<i>CETP</i>	<i>CFH</i>	
		<i>CMA1</i>	<i>CTLA4</i>	<i>CXCL12</i>	<i>CYBA</i>	<i>EDN1</i>	<i>EPO</i>	<i>F12</i>	<i>F5</i>	<i>F7</i>
		<i>FGB</i>	<i>FGF2</i>	<i>FN3K</i>	<i>GCH1</i>	<i>GHRL</i>	<i>GLO1</i>	<i>GNB3</i>	<i>GP1BA</i>	
		<i>GPX1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>GSTT1</i>	<i>HFE</i>	<i>HIF1A</i>	<i>HLA-DQA1</i>		
		<i>HLA-DQB1</i>		<i>HLA-DRB1</i>	<i>HMOX1</i>	<i>HP</i>	<i>HSPA1B</i>			
		<i>HSPA1L</i>	<i>LHTRA1</i>	<i>ICAM1</i>	<i>IGF1</i>	<i>IGFBP1</i>	<i>IL1R1</i>	<i>IL6</i>	<i>ITGA2</i>	
		<i>ITGA2B</i>	<i>ITGB2</i>	<i>ITGB3</i>	<i>KCNJ11</i>	<i>LIPC</i>	<i>LPL</i>	<i>LTA</i>	<i>MBL2</i>	
		<i>MIOX</i>	<i>MMP1</i>	<i>MMP2</i>	<i>MMP3</i>	<i>MMP9</i>	<i>MTHFR</i>	<i>MTRR</i>	<i>NEUROD1</i>	
		<i>NFKB1</i>	<i>NOS1AP</i>		<i>NOS2</i>	<i>NOS2A</i>	<i>NOS3</i>	<i>NPY</i>	<i>OPRM1</i>	
		<i>PARL</i>	<i>PECAM1</i>		<i>PON1</i>	<i>PON2</i>	<i>PPARA</i>	<i>PPARG</i>	<i>PPARGC1A</i>	
		<i>PRKAG2</i>		<i>PRKCB</i>	<i>PRKCB1</i>		<i>PTPN1</i>	<i>PVT1</i>	<i>RAGE</i>	<i>REN</i>

		RETN	SDS	SELE	SERPINE1	SERPINF1	SFRS15
		SLC12A3		SLC2A1	SLC2A10	SOD1	SOD2
		TCF7L2	TGFB1	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TLR4
		TSC22D1		TXNIP	UCP1	UCP2	VDR
		VWF				VEGF	VEGFA
Cetoacidose	ACPI	CTLA4	G6PD	GCK	HLA-DQA1	HLA-DQB1	HLA-DRB1
		HNFA1	HNFB1	HNFA4	NEUROD1	NEUROG3	PAX4
		PDX1	PYGL	TCF1	TRNL1		
Complicações diabéticas	A2M	ABCA1	ABCB1	ABCC8	ABCG2	ABL1	ABL2
		ACAA1	ACACB				
		ACAT1	ACE	ACE2	ACP1	ACTN3	ACTN4
		ADAMTS9					
		ADD1	ADD2	ADH1A	ADH1B	ADIPOQ	ADIPOR1
		ADIPOR2		ADM	ADNP	ADORA2A	ADRA1A
		ADRA2A		ADRA2B	ADRB1	ADRB2	ADRB3
		AGER	AGT				
		AGTR1	AGTR2	AHR	AHSG	AKR1B1	AKR1B10
		AKT1					
		ALDH2	ALOX12	ALOX15	ALOX5	ALOX5AP	ALPL
		ANKMY1					
		ANKS1B		APBB1	APBB2	APEX1	APH1A
		APH1B	APOA1				
		APOA4	APOA5	APOB	APOC1	APOC3	APOE
		AR	ARF1				
		BACE1	BACE2	BCHE	BDKRB1	BDKRB2	BDNF
		BGLAP	BID	BLMH	BMP1	BMP2	BMP3
		BMP4	BMP7				
		BNC2	BRD8	C10orf2	C3	C4B	CA1
		CACNA1A					
		CALCR	CALD1	CAMK1D	CAPN10	CARS	CASP12
		CASP3	CASR	CAT	CBS	CCL2	CCL5
		CCNI	CCR1				
		CCR2	CCR5	CD40	CD40LG	CD9	CDC123
		CDH11	CDH13	CDH22	CDKAL1	CDKN2A	CDKN2B
		CEBPA	CEBPD	CETP	CFB	CFH	CFTR
		CHAT	CHN2				
		CIITA	CLU	CMA1	CNDP1	CNDP2	CNP
		COL1A1					
		COMP	COMT	CPE	CPT1A	CPT1B	CPVL
		CR1	CREB1				
		CREBBP		CREM	CRP	CSF2	CSK
		CST3	CTGF				
		CTLA4	CTNNA3		CTSD	CTSK	CX3CL1
		CXCL12	CYBA				
		CYP11B2		CYP17A1		CYP19A1	CYP26A1
		CYP27B1		CYP2C19		CYP2D6	CYP2R1
		CYP46A1					
		DCN	DDOST	DGAT1	DLST	DNASE1	DRD1
		DRD2					
		DRD3	DRD4	ECE1	EDN1	EDNRA	EDNRB
		EGR2	EGR3				
		ELAC2	ELMO1	ELMO2	ELN	ENPP1	ENTPD1
		EPO					
		ESR1	ESR2	F10	F12	F2	F3
		F5	F7				
		FABP2	FAS	FGA	FGB	FGF1	FGF13
		FGF2	FGF23				
		FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGG	FMN2	FN3K
		FRAP1	FRK				
		FRMD3	FSHR	FTO	G6PD	GAD2	GAPDH
		GC	GCH1				
		GCK	GCLM	GDF15	GFPT1	GFPT2	GH1
		GHR	GHRH				
		GHRHR	GHRL	GLO1	GNB3	GP1BA	GPAM
		GPX1	GRB2				
		GREM1	GSC	GSTA4	GSTM1	GSTP1	GSTT1
		HAS2	HAS3				
		HFE	HHEX	HIF1A	HINT2	HLA-A	HLA-DQA1
		HLA-DQB1					
		HMCN1	HMGCR			HMGCS1	HMGCS2
		HMOX1	HNFA1	HNFB1	HNFA4	HOXD13	HP
		HPGD					
		HSD11B1		HSD11B2	HSPA1A	HSPA1B	
		HSPA1L	HSPB1	HSPD1	HTRA1	ICAM1	IDE
		IFNG	IFNGR1				
		IGF1	IGF1R	IGF2	IGF2BP2	IGF2R	IGFBP1
		IGFBP2					
		IGFBP3	IGFBP4	IGFBP5	IGFBP6	IL10	IL11
		IL12A	IL18				
		IL18R1	IL1A	IL1B	IL1R1	IL1RN	IL2
		IL3	IL4	IL6			
		IL6R	IL8	INS	INSIG1	IRS1	IRS2
		IRS4	ITGA2				
		ITGA2B	ITGB2	ITGB3	JAZF1	KCNJ11	KCNQ1
		KDR	KIRREL				
		KLF5	KLRA1	KNG1	LCAT	LCN1	LCT
		LDLR	LEPR				
		LGALS3	LHCGR	LIPC	LMNA	LPL	LRAT
		LRP1	LRP5				
		LRPAP1	LRRC7	LTA	LTB4R	LTC4S	MAPT
		MBL2	MCF2L2				
		MIA3	MIOX	MLX	MLXIPL	MLYCD	MME
		MMP1	MMP16				
		MMP19	MMP2	MMP3	MMP9	MPO	MSR1
		MT1A	MT1E				
		MT2A	MTHFD1L		MTHFR	MTNR1B	MTR
		MTRR					
		MYC	MYH9	NCALD	NCSTN	ND2	NEUROD1
		NEUROG3					
		NFKB1	NFRKB	NOS1	NOS1AP	NOS2	NOS2A
		NOS3					
		NOTCH2		NOX1	NOX4	NPC1	NPHS1
		NPHS2	NPPA				

NPPB NPY NPY2R NQO1 NR1H2 NR1H4 NRF1 OGG1
 OLR1 OPRM1 P2RX7 P2RY12 PARD6A PARK2 PARL
 PARP1 PCBD1 PCSK1 PCSK2 PDE4D PDGFRA PDGFRB
 PEA15 PECAM1 PGM3 PHACTR2 PHEX PHF12
 PIK3CA PIP4K2B PLA2G2D PLA2G4A PLA2G7
 PLAT PLAU PLEKHH2 PNPLA3 POLG PON1
 PON2 POSTN PPARA PPARD PPARG PPARGC1A PPARGC1B
 PRDM2 PREX1 PRKAA1 PRKAB1 PRKAB2
 PRKACB PRKAG2 PRKAG3 PRKCB PRKCB1
 PRKCSH PRNP PSEN1 PSEN2 PSENEN PSRC1
 PTBP1 PTGER1 PTGER2 PTGER3 PTGER4
 PTGES PTGFR PTGIR PTGIS PTGS1 PTGS2 PTH PTH1R
 PTPN1 PVT1 RAGE RARA RARB RARG RBP4 REG3A REN
 RETN RNASEL RUNX2 RXRA RXRB RXRG S100A6
 SAA1 SAA2 SCAP SCD SDC2 SDS SELE SELP
 SERPINA3 SERPINC1 SERPINE1 SERPINF1
 SEZ6L SFRS15 SHB SLC11A1 SLC12A3 SLC12A5
 SLC13A3 SLC22A1 SLC22A2 SLC22A3
 SLC2A1 SLC2A10 SLC2A2 SLC2A4 SLC30A8 SLC6A4
 SMAD1 SMAD3 SMAD4 SMAD5 SNAP25 SNCA SOCS1 SOD1
 SOD2 SOD3 SORCS1 SOX2 SOX3 SPARC SPINK1 SPP1
 SRD5A2 SREBF1 SRF SST STK11 STX1A SUMO4 TAF1
 TBXA2RTBXAS1 TCF1 TCF2 TCF7L2 TF TFAM TFB1M
 TFB2M TFCP2 TGFB1 TGFB1 TGFB2 THADA
 THBD THRA THRB TIMP1 TIMP2 TIMP3 TLR2 TLR4
 TMBIM6 TMPO TNF TNFAIP1 TNFAIP2
 TNFAIP3 TNFRSF11A TNFRSF11B TNFRSF1A
 TNFRSF1B TNFRSF6B TNFSF11 TNNI3 TP53
 TPH2 TPT1 TRAF1 TRAF2 TRAF3 TRAF4 TRAF5 TRAF6
 TRIB3 TRNL1 TRPC1 TSC22D1 TSPAN8 TTPA TXNIP
 TYMP UBQLN1 UCP1 UCP2 UCP3 UNC13B
 USF1 USF2 VAMP2 VCAM1 VDR VEGF VEGFA VGF
 VKORC1 VLDLR VTI1A VTI1B VWF WDR72 WFS1
 XYLT1 XYLT2 ZMIZ1

A2M ABCA1 ABCA2 ABCA3 ABCA4 ABCA7 ABCB1 ABCB11 ABCB4
 ABCB8 ABCC1 ABCC3 ABCC4 ABCC5 ABCC8 ABCC9 ABCD3
 ABCG1 ABCG2 ABCG4 ABCG5 ABCG8 ABL1 ABL2 ABLIM1
 ABO ACAA1 ACAA2 ACACA ACACB ACAD10 ACADL
 ACADMACADS ACADSB ACAN ACAP3 ACAT1 ACAT2 ACE
 ACE2 ACER3 ACHE ACN9 ACOT11 ACP1 ACSM1
 ACSM3 ACSS2 ACTA1 ACTA2 ACTC1 ACTL6 BACTN3 ACTN4
 ACVRL1 ADA ADAD1 ADAM10 ADAM12
 ADAM17 ADAM30 ADAM33 ADAMTS17
 ADAMTS9 ADAMTSL1 ADAMTSL3 ADAP2 ADCY3
 ADCY5 ADCYAP1 ADD1 ADD2 ADD3 ADH1A ADH1B
 ADH1C ADH7 ADIPOQ ADIPOR1 ADIPOR2
 ADK ADM ADNP ADORA1 ADORA2A ADORA2B
 ADORA3 ADRA1A ADRA1B ADRA1D
 ADRA2A ADRA2B ADRA2C ADRB1 ADRB2
 ADRB3 ADRBK1 ADRBK2 AFF1 AGBL5 AGER
 AGPAT1 AGRP AGT AGTR1 AGTR2 AGTRAP
 AHCY AH11 AHR AHSG AIF1 AIFM1 AIRE AKAP10
 AKNA AKR1B1 AKR1B10 AKT1 AKT2 AKT3 ALAS1 ALB
 ALCAM ALDH1B1 ALDH1L1 ALDH2 ALDH7A1
 ALMS1 ALOX12 ALOX15 ALOX5 ALOX5AP ALPL ALX4
 AMAC1L2 AMBP AMELX AMOT AMPD1 AMPD2 AMT
 ANAPC13 ANGPT4 ANGPTL3 ANGPTL4
 ANK2 ANKMY1 ANKRD13D ANKRD27 ANKRD40
 ANKRD52 ANKRD60 ANKS1A ANKS1B
 ANO1 ANP32A ANXA1 ANXA2 ANXA4 AP3B1 AP3S1 AP3S2

Diabetes

APAF1 APBB1 APBB2 APC APC2 APCS APEX1 APH1A
 APH1B APITD1 APLN APOA1 APOA2 APOA4 APOA5 APOB
 APOBEC1 APOC1 APOC2 APOC3 APOC4 APOD APOE
 APOF APOH APOL1 APOLD1 APOM APOO APP
 APPL APPL1 AQP1 AQP10 AQP2 AQP3 AQP7 AR
 ARF1 ARF3 ARG1 ARHGAP4 ARHGAP6 ARHGAP8
 ARHGEF1 ARHGEF11 ARHGEF12 ARHGEF5
 ARL15 ARL6 ARMC9 ARMS2 ARNT ARNTL ARNTL2ARSB
 ART3 AS ASAH1 ASCC3 ASF1B ASIP ASPSCR1
 ASS1 ASTL ATAD3B ATAD5 ATF1 ATF2 ATF3
 ATF6 ATF6B ATG9B ATIC ATM ATOH8 ATP10DATP13A1
 ATP13A3 ATP1A1 ATP1A2 ATP1B1 ATP2A2 ATP2B1 ATP2B2
 ATP5B ATP5O ATP6 ATP6AP1 ATP6V0D1 ATP6V1B1
 ATP6V1D ATP6V1G2 ATP8 ATP8B2 ATPBD4
 ATRIP ATXN3 AUTS2 AVEN AVPR1A AVPR2 AXIN1 AXL
 B2M B3GALT6 B3GAT2B3GNT9 B4GALNT1
 BACE1 BACE2 BACH2 BAD BAG1 BAG3 BAG4 BAG5
 BAH1D1 BAI3 BAK1 BANK1 BAT1 BAT2 BAT3 BAT4 BAX
 BAZ1B BBS2 BCAR3 BCAS3 BCAT1 BCDIN3D BCHE
 BCKDK BCL11A BCL2 BCL2A1 BCL2L10 BCL2L12
 BCL2L14 BCL2L2 BCL7B BCL9 BCMO1 BCO2 BDKRB1
 BDKRB2 BDNF BGLAP BHLHE40 BHLHE41
 BHMT BHMT2 BID BIK BIRC2 BIRC3 BLM BLMH
 BMP1 BMP10 BMP2 BMP3 BMP4 BMP6 BMP7 BMPR1A
 BNC2 BPI BRCA2 BRD8 BRIP1 BRPF1 BRS3 BSG BSN
 BSND BTBD11 BTC BTK BTLA BTN3A2 BTNL2 BUD13
 BVES BZW2 C10orf140 C10orf2 C10orf55 C10orf59
 C10orf79 C11orf10 C11orf17 C11orf9 C12orf30
 C14orf181 C14orf21 C15orf41 C15orf62
 C16orf62 C16orf70 C17orf50 C17orf78
 C18orf45 C18orf56 C19orf25 C19orf29
 C1orf110 C1orf125 C1orf167 C1QA C1QBP
 C1QC C1QTNF6 C2 C20orf27 C21orf34
 C2CD4A C2CD4B C2orf65 C2orf86 C3 C4A C4B
 C4orf32 C5 C5orf23 C6 C6orf1 C6orf10 C6orf106
 C6orf138 C6orf170 C6orf173 C6orf217
 C6orf25 C6orf27 C6orf47 C6orf48 C7 C7orf10 C8A C8orf85 C9
 C9orf171 CA1 CA9 CABIN1 CABLES1 CACNA1A
 CACNA1C CACNA1D CACNA1E CACNA1G
 CACNA1H CACNG4 CADM1 CADPS CALCA CALCR
 CALD1 CALM1 CALM2 CALM3 CALR CALU CAMK1 CAMK1D
 CAMK1G CAMK2G CAMTA1 CANT1 Canx
 CAP1 CAPN10 CAPN2 CAPN5 CAPN6 CAPNS1
 CAPNS2 CAPSL CAPZA3 CARD10 CARD15
 CARD16 CARS CARTPT CASP1 CASP12 CASP3
 CASP7 CASP8 CASP9 CASQ1 CASR CAST CAT CATSPER4
 CAV1 CAV2 CAV3 CBL CBLB CBS CCDC114
 CCDC132 CCDC57 CCDC61 CCDC86
 CCKAR CCKBR CCL11 CCL18 CCL2 CCL20 CCL21 CCL27
 CCL28 CCL3L1 CCL5 CCM2 CCND2 CCNI CCNY CCR1
 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCRN4L CD14 CD22
 CD226 CD274 CD28 CD36 CD37 CD38 CD3E CD4
 CD40 CD40LG CD44 CD48 CD53 CD58 CD69
 CD72 CD74 CD79A CD79B CD86 CD9 CD97 CDC123
 CDC2L2 CDCA3 CDH11 CDH13 CDH22 CDH5 CDHR5
 CDIPT CDK2 CDK4 CDK5 CDK5R1 CDK5RAP1
 CDK6 CDKAL1 CDKN1A CDKN1B CDKN1C
 CDKN2A CDKN2B CDS1 CDS2 CEACAM1
 CEBPA CEBPD CEL CELA1 CELA2A CELF2 CELF3
 CELSR2 CENPP CEP250 CEP57 CEP63 CERKL CES2 CETP CFB

CFD	CFH	CFHR1	CFLAR	CFP	CFTR	CGREF1	
CHAT	CHCHD10		CHCHD7		CHGB	CHI3L1	CHIT1
CHKB	CHN2	CHRD	CHRM1	CHRM2	CHRM3	CHRM5	CHRNA1
CHRNA5		CHUK	CIB1	CIC	CIITA	CISH	CIT
CKM	CLASP1	CLCA1	CLCC1	CLCN1	CLCN6	CLCNKA	
CLCNKB		CLEC16A		CLEC1B		CLIC1	CLOCK
CLPS	CLPTM1		CLTA	CLTB	CLTC	CLU	CLUL1
CMA1	CNDP1	CNDP2	CNN1	CNP	CNR1	CNR2	CNTF
CNTLN	CNTN4	CNTN5	CNTNAP2		COIL	COL11A1	
COL11A2		COL16A1		COL18A1		COL1A1	
COL1A2		COL24A1		COL28A1		COL2A1	
COL3A1		COL4A1		COL4A2		COL4A5	
COL4A6		COL5A1		COL5A2		COL8A1	
COL9A1		COL9A2		COMMD10		COMMD5	
COMP	COMT	CORIN	COX1	COX2	COX3	COX7A1	
CPA6	CPAMD8		CPB2	CPE	CPEB4	CPNE9	CPS1
CPSF2	CPSF3	CPSF4	CPT1A	CPT1B	CPT1C	CPT2	CPVL
CRABP2		CRADD	CRAT	CREB1	CREBBP		CREM
CRHR1	CRISPLD2		CRKL	CRLF3	CRP	CRTC1	CRTC2
CRY2	CRYBA2		CSDE1	CSF1	CSF2	CSF2RBCSF3	
CSHL1	CSK	CSMD2	CSN3	CSNK1A1		CSNK1D	
CSNK1E		CSNK2A1		CSNK2A2		CSNK2B	
CSRP3	CST1	CST3	CSTB	CTDSP1		CTF1	CTGF
CTH	CTLA4	CTNNA1		CTNNA2		CTNNA3	
CTNNB1		CTNNBL1		CTSB	CTSD	CTSF	CTSG
CTSH	CTSK	CTSL2	CTSS	CUBN	CX3CL1	CX3CR1	
CXCL10	CXCL12	CXCL16	CXCL5	CXCL9	CXCR1	CXCR2	CXCR4
CXCR5	CYB5R1	CYB5R4	CYBA	CYLD	CYP11B1		CYP11B2
CYP17A1		CYP19A1		CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1	CYP24A1
CYP26A1		CYP27A1		CYP27B1		CYP2C19	
CYP2C8	CYP2C9	CYP2D6		CYP2E1	CYP2J2	CYP2R1	CYP3A4
CYP3A5	CYP46A1		CYP4A11		CYP4B1	CYP4F2	CYP7A1
CYP7B1	CYSLTR1		CYSLTR2		CYTB	DAB1	DACH1
DACH2	DAG1	DARC	DARS2	DAXX	DBH	DBI	DBP
DCD	DCN	DCTN5	DDAH1	DDAH2	DDC	DDI1	DDIT3
DDN	DDOST	DDT	DDTL	DEF6	DEFB1	DENND1A	DES
DFNB59		DGAT1	DGAT2	DGCR14		DGKB	DGKE
DGKG	DHCR7	DHFR	DIABLO		DIO2	DIP2C	
DKFZp68601327			DLC1	DLEU7	DLG3	DLG4	DLGAP1
DLGAP2		DLK1	DLST	DMD	DMGDH		DMP1
DMPK	DNAJB11		DNAJC17		DNAJC4		DNASE1
DNASE1L1		DNM3	DOCK2	DOCK7	DOK2	DOK5	DOM3Z
DOTIL	DPP10	DPP4	DPP6	DPPA4	DRD1	DRD2	DRD3
DRD4	DSG2	DSP	DUOX2	DUSP1	DUSP10		DUSP12
DUSP2	DUSP23		DUSP5	DUSP6	DUSP9	DVL2	DYM
EBF2	ECE1	ECHS1	EDAR	EDN1	EDN2	EDN3	EDNRA
EDNRB	EFEMP1		EFR3B	EFTUD1		EGF	EGFL7
EGFL8	EGFR	EGR2	EGR3	EIF2A	EIF2AK3		EIF2B1
EIF2B2	EIF2B5	EIF2C1	EIF4EBP2		EIF4H	EIF6	ELAC2
ELAVL1	ELK1	ELMO1	ELMO2	ELMOD1		ELN	EMD
EMID1	EMILIN2		EN1	ENDOGL1		ENG	ENPP1
ENTPD1		ENTPD6		EP300	EPAS1	EPHA1	EPHB2
EPHX1	EPHX2	EPO	ERAP1	ERBB3	ERBB4	ERCC2	ERCC6
ERI2	ERI3	ERN1	ERN2	ERP44	ERVK7	ERVWE1	
ESR1	ESR2	ESRRA	ESRRG	ETNK1	ETV5	ETV6	EVC
EXOC4	EXT2	EYA2	EZR	F10	F11	F11R	F12
F13A1	F13B	F2	F2R	F2RL1	F2RL2	F2RL3	F3
F7	F8	F8A1	F9	FAAH	FABP1	FABP2	FABP3
FABP4	FABP5	FABP6	FADS1	FADS2	FADS3	FAF1	FAIM
FAIM2	FAM107B		FAM114A1		FAM135A		FAM151A

FAM167A	FAM167B	FAM188B	FAM189A1
FAM189B	FAM19A1	FAM32A	FAM50A
FAM71E2	FAM83E	FANCA FANCC	FANCG FANCM
FARS2 FAS	FASLG FASN	FASTKD3	FBL FBLN5
FBN1 FBN2	FBN3 FBXL8	FBXO38	FCER1G
FCGR2A	FCGR3A	FCGR3B	FCHSD1
FCRL3 FDFT1	FEM1A FEM1B	FER FES	FEV FFAR1
FGA FGB	FGF1 FGF13	FGF2 FGF23	FGFR1 FGFR2
FGFR3 FGFR1	FGG FGL1	FHIT	FHL5 FIBP
FIGN FKBP1A	FKBP1AP4	FKBP2 FKBP3	FLII
FLNA FLNC	FLT1 FLT3	FLT4 FMN2	FN1 FN3K
FNDC4 FOLH1	FOLR1 FOLR2	FOS FOSL1	FOXA2 FOXC1
FOXC2 FOXO1	FOXO1A	FOXO3 FOXP1	FOXP2 FOXP3
FOXP4 FOXRED1	FRA1H FRAP1	FRK FRMD3	FRMD4B
FRMPD4	FSD2 FSHR	FTCD FTO	FURIN FUS
FUT3 FUT6	FXN FXYD5	FXYD7 FYN	G6PC G6PC2
G6PD GAA	GAB1 GAB2	GAB3 GABRA1	GABRA2
GABRA4	GABRA5	GAD2 GAL	GALK1 GALNT2
GALR1 GALT	GAPDH GAS7	GATA2 GATA4	GATA6 GATAD1
GBA GBE1	GBF1 GC	GCDH GCG	GCGR GCH1
GCHFR GCK	GCKR GCLC	GCLM GDF15	GDF5 GFPT1
GFPT2 GG CX	GGNBP1	GH1 GHR	GHRH GHRHR
GHRL GHSR	GIMAP5	GIP GIPC1	GIPR GJA1
GJA4 GJA5	GJC1 GLA	GLIPR1 GLIS3	GLO1 GLP1R
GLP2R GLT25D2	GLTPD1	GMIP GMNN	GNA12
GNA14 GNAI1	GNAI2 GNAS	GNB3 GNG2	GNG8 GNPDA2
GOLGA7	GORASP1	GP1BA GP5	GP6 GPAM
GPATCH4	GPATCH8	GPBAR1	GPC5 GPD2
GPHN GPR109A	GPR109B	GPR116GPR126	GPR132
GPR44 GPR55	GPR81 GPR98	GPSM3 GPX1	GPX2 GPX3
GPX4 GPX5	GPX6 GPX7	GRB10 GRB2	GREM1 GRIN3A
GRK4 GRK5	GRK6 GRK7	GRM1 GRM3	GRM5 GRM7
GRN GSC	GSDMB GSK3B	GSR GSS	GSTA1 GSTA2
GSTA4 GSTK1	GSTM1 GSTM2	GSTM3 GSTM4	GSTO1 GSTO2
GSTP1 GSTT1	GTF3C5	GTPBP3	GTSE1 GYS1
GYS2 GZMH	HABP2 HACE1	HADH HAS2	HAS3 HAVCR1
HAVCR2	HBB HBEGF	HCFC1 HCFC1R1	HCN2
HCN4 HCRTR2	HDAC10	HDAC2 HDAC4	HDAC5
HDAC6 HDAC7	HDAC8 HDAC9	HDLBP HEBP1	HERC2 HES7
HEXB HFE	HFE2 HGF	HHEX HHIP	HIF1A HINFP
HINT2 HIRA	HIVEP3 HK1	HLA-A HLA-B	HLA-C HLA-DMA
HLA-DMB	HLA-DOA	HLA-DPA1	HLA-DPB1
HLA-DQA1	HLA-DQA2	HLA-DQB1	HLA-DRA
HLA-DRB1	HLA-DRB2	HLA-DRB3	HLA-DRB5
HLA-DRB6	HLA-DRB9	HLA-G HMBS	HMCN1 HMGA1
HMGA2 HMGCR	HMGCS1	HMGCS2	HMHA1
HMOX1 HNF1A	HNF1B HNF4A	HNRNPA1	HNRNPH2
HNRNPUL1	HOXD13	HP HPCAL1	HPGD
HPGDS HPR	HPX HRASLS2	HRG HRH1	HRH2
HSD11B1	HSD11B2	HSD17B1	HSD17B4
HSD17B8	HSD3B1	HSD3B2	HSF4 HSH2D
HSP90AA1	HSP90AB1	HSP90B1	HSPA12B
HSPA1A	HSPA1B	HSPA1LHSPA4	HSPA8 HSPB1
HSPB7 HSPD1	HSPG2 HTR1B	HTR2A HTR2B	HTR2C HTR3A
HTR3B HTR3D	HTRA1 HTT	HYMA1 HYOU1	IAPP IARS2
IBD5 ICAM1	ICAM3 ICAM4	ICAM5 ICOS	ICOSLGID3
IDDM12	IDDM2 IDDM3	IDDM4 IDDM5	IDDM8 IDE IDS
IFIH1 IFNA1	IFNAR1 IFNAR2	IFNB1 IFNG	IFNGR1 IFNGR2
IFNW1 IGF1	IGF1R IGF2	IGF2AS IGF2BP1	IGF2BP2
IGF2BP3	IGF2R IGFBP1	IGFBP2 IGFBP3	IGFBP4 IGFBP5

IGFBP6	IGHV3-75	IHH	IKBKAPIKBKE	IKBKG	IKZF2		
IKZF4	IL10	IL10RA	IL10RB	IL11	IL11RA	IL12A	IL12B
IL12RB1		IL12RB2		IL13	IL13RA1		IL15 IL16
IL17C	IL17F	IL17RB	IL18	IL18R1	IL18RAP		IL19
IL1A	IL1B	IL1F10	IL1F5	IL1F6	IL1R1	IL1R2	IL1RAP
IL1RAPL1		IL1RN	IL2	IL20	IL20RA	IL21	IL21R
IL23R	IL26	IL27	IL2RA	IL2RB	IL3	IL32	IL4
IL4R	IL5	IL5RA	IL6	IL6R	IL6ST	IL7	IL7R IL8
IL9	ILF3	IMMP1L		INMT	INPP1	INPP4B	INPP5DINS
INSIG1	INSIG2	INS-IGF2		INSR	IPCEF1	IPF1	IQCK
IQGAP2	IRAK1	IRAK2	IRAK3	IRAK4	IRF3	IRF5	IRF8
IRGM	IRS1	IRS2	IRS4	IRX4	ISCA2	ISG15	ISL1
ISPD	ITGA1	ITGA2	ITGA2B	ITGA4	ITGAL	ITGAM	ITGAV
ITGB1	ITGB2	ITGB3	ITGB4	ITGB5	ITGB6	ITGBL1	ITLN1
ITLN2	ITPKB	ITPR2	ITPR3	JAG1	JAK1	JAK2	JAK3
JAM3	JAZF1	JMJD7	JMJD7-PLA2G4B			JUN	KCNA1
KCNA10		KCNA3	KCNA5	KCNC1	KCNE1	KCNE2	KCNE3
KCNH2	KCNH4	KCNH7	KCNH8	KCNIP1	KCNJ1	KCNJ10	KCNJ11
KCNJ15	KCNJ2	KCNJ9	KCNK1	KCNK2	KCNK4	KCNMB1	
KCNN3	KCNQ1	KCNQ3	KCNQ5	KCTD12		KCTD15	
KDR	KHK	KIAA0664		KIAA0748		KIAA1109	
KIF11	KIF5A	KIFC3	KIR2DL1		KIR2DL2		KIR2DL3
KIR2DL4		KIR2DL5A		KIR2DL5B		KIR2DP1	
KIR2DS1		KIR2DS2		KIR2DS3		KIR2DS4	
KIR2DS5		KIR3DL1		KIR3DL2		KIR3DL3	
KIR3DS1		KIRREL	KIRREL2		KITLG	KL	KLC1
KLC3	KLF1	KLF10	KLF11	KLF12	KLF13	KLF15	KLF16
KLF2	KLF3	KLF4	KLF5	KLF6	KLF7	KLF8	KLHDC1
KLHL29	KLK1	KLK15	KLK2	KLK3	KLRA1	KNG1	KRR1
KSR2	L1CAM	L3MBTL4		LACE1	LAG3	LAMA1	LAMA5
LAMC3	LAMP2	LAMP3	LARS2	LASS4	LBH	LBP	LBR
LCAT	LCN1	LCORL	LCP1	LCT	LDLR	LDLRAP1	
LEFTY1	LEP	LEPR	LEPROT		LGALS1	LGALS2	LGALS3
LGR5	LHCGR	LIF	LIG1	LILRB1	LILRB3	LIN28B	LIN7C
LIPA	LIPC	LIPE	LIPF	LIPG	LLGL1	LMAN1	LMNA
LMNB1	LMNB2	LMOD1	LMX1A	LOC100127899		LOC100127913	
LOC100127944		LOC100127946		LOC100128095		LOC100128994	
LOC100129500		LOC100129619		LOC100129623		LOC100129652	
LOC100129720		LOC100129857		LOC100130116		LOC100130288	
LOC100130476		LOC100130859		LOC100131311		LOC100131540	
LOC100131646		LOC100131673		LOC100131774		LOC100131778	
LOC100131909		LOC100132839		LOC100133070		LOC100133511	
LOC100133949		LOC100134017		LOC100286880		LOC100286919	
LOC100286983		LOC100287002		LOC100287015		LOC100287123	
LOC100287132		LOC100287133		LOC100287143		LOC100287174	
LOC100287206		LOC100287237		LOC100287239		LOC100287253	
LOC100287255		LOC100287264		LOC100287322		LOC100287376	
LOC100287380		LOC100287391		LOC100287398		LOC100287415	
LOC100287442		LOC100287504		LOC100287550		LOC100287611	
LOC100287659		LOC100287661		LOC100287744		LOC100287761	
LOC100287770		LOC100287776		LOC100287805		LOC100287830	
LOC100287870		LOC100287972		LOC100287976		LOC100287997	
LOC100288045		LOC100288047		LOC100288068		LOC100288077	
LOC100288128		LOC100288133		LOC100288152		LOC100288183	
LOC100288204		LOC100288205		LOC100288213		LOC100288270	
LOC100288312		LOC100288344		LOC100288346		LOC100288353	
LOC100288387		LOC100288400		LOC100288432		LOC100288449	
LOC100288457		LOC100288535		LOC100288545		LOC100288581	
LOC100288589		LOC100288722		LOC100288791		LOC100288795	
LOC100288810		LOC100288912		LOC100288941		LOC100288985	

LOC100288992	LOC100289003	LOC100289010	LOC100289011
LOC100289065	LOC100289107	LOC100289130	LOC100289153
LOC100289223	LOC100289233	LOC100289235	LOC100289251
LOC100289309	LOC100289314	LOC100289329	LOC100289398
LOC100289437	LOC100289447	LOC100289461	LOC100289552
LOC100289577	LOC100289609	LOC100289982	LOC100290016
LOC100290084	LOC100290144	LOC100290264	LOC100290498
LOC100290634	LOC100290665	LOC100290747	LOC100290913
LOC100291014	LOC100291029	LOC100291317	LOC100291596
LOC100291664	LOC100291860	LOC100291870	LOC100292018
LOC100292080	LOC100292100	LOC100292154	LOC100292257
LOC100292270	LOC100292381	LOC100292420	LOC100292463
LOC100292503	LOC100292519	LOC100292553	LOC100292696
LOC100292782	LOC100292825	LOC100293006	LOC100293050
LOC100293186	LOC100293322	LOC100293352	LOC100293367
LOC100293428	LOC100293435	LOC100293499	LOC100293622
LOC100293638	LOC100293689	LOC100293737	LOC100293959
LOC100293975	LOC100294096	LOC100294106	LOC100294113
LOC100294116	LOC100294128	LOC100294135	LOC100294146
LOC100294154	LOC100294156	LOC100294159	LOC100294163
LOC100294183	LOC100294184	LOC100294185	LOC100294187
LOC100294192	LOC100294209	LOC100294213	LOC100294218
LOC100294219	LOC100294220	LOC100294223	LOC100294225
LOC100294248	LOC100294257	LOC100294262	LOC100294268
LOC100294270	LOC100294271	LOC100294274	LOC100294279
LOC100294309	LOC100294311	LOC100294312	LOC100294315
LOC100294319	LOC100294358	LOC100294369	LOC100294372
LOC100294386	LOC100294416	LOC100294438	LOC100294439
LOC100294450	LOC284889	LOC285501	LOC387761
LOC400682	LOC644662	LOC645722	LOC647055
LOC729526	LOC729991	LOC729991-MEF2B	LOC730011
LOC732146	LOC732419	LPA	LPAR1 LPAR3 LPCAT2
LPIN1	LPIN2	LPL	LPP LPXN LRAT LRGUK LRP1
LRP2	LRP5	LRP6	LRP8 LRPAP1LRRC7 LSM2 LSP1 LSS
LST1	LTA	LTA4H	LTB LTB4R LTBP4 LTC4S LUC7L
LUM	Lvis1	LY6G5BLY6G6CLY96	LYN LYPD5 LYRM4
LZIC	MACF1	MADD	MAF MAFA Mageb1 MAGI2 MAMLI
MAN2A1	MAOA	MAOB	MAP1D MAP2 MAP2K5
MAP2K6	MAP3K1	MAP3K3	MAP3K5
MAP3K6	MAP4K2	MAP4K3	MAP7 MAPK1
MAPK11	MAPK12	MAPK13	MAPK14
MAPK7	MAPK8	MAPKAP1	MAPKAPK3 MAPKBPI
MAPT	9-Mar	MARS	MAS1 MASP2 MAT1A MAT2A MAT2B
MATN2	MBL2	MBTPS1	MC2R MC3R MC4R MC5R
MCF2L2	MCHR1	MCL1	MCM10 MCM8 MDGA2 Mdm4
MECP2	MED1	MED12L	MED22 MED23 MEF2A MEF2B
MEF2C	MEF2D	MEFV	MEIS1 Meis2 MEN1 METTL1
MFAP1	MFAP3	MGAM	MGAT4B MGAT5B MGEA5
MGLL	MGMT	MGP	MIA3 MICA MICAL1MICB MIF
MIOX	MIP	MKKS	MLL3 MLLT10MLX MLXIPLMLYCD
MMAB	MMADHC	MME	MMP1 MMP10 MMP11 MMP12
MMP13	MMP14	MMP15	MMP16 MMP19 MMP2 MMP20 MMP24
MMP25	MMP26	MMP27	MMP3 MMP8 MMP9 MOG MOS
MPDZ	MPHOSPH9	MPO	MRPL10 MRPL42
MRPS18A	MS	MS4A2	MSH3 MSH5 MSI2 MSR1
MSRA	MST1R	MT1A	MT1E MT2A MTAP MTCH2 MTHFD1
MTHFD1L	MTHFR	MTHFSD	MTIF2 MTIF3 MTMR9
MTNR1A	MTNR1B	MTO1	MTP18 MTR MTRR
MTTP	MVD	MVK	MX2 MYB MYBPC1 MYBPC2
MYBPC3	MYC	MYD88	MYH1 MYH3 MYH4 MYH6

MYH7B MYH8 MYH9 MYL3 MYLK MYO16 MYO1D MYO6
 MYO7A MYO9B MYOCMDYOD1 MYOF MYOT MYST1 MYST2
 MZT2A MZT2B NAA10 NAB2 NACA2 NADSYN1 NAGS
 NAMPT NAP1L5 NAT1 NAT2 NAV3 NBEA NCALD NCAM1
 NCAPG NCAPH2 NCF1 NCF2 NCF4 NCKAP5
 NCOA1 NCOA2 NCOA3 NCOA5 NCOA6 NCOR1 NCR3 NCSTN ND1
 ND2 ND3 ND4 ND4L ND5 ND6 NDST3 NDUFAB1
 NDUFB6 NDUFC2 NDUFS2 NDUFV2 NEB
 NEBL NEGR1 NELL1 NETO1 NEUROD1 NEUROD2
 NEUROG3 NEXN NF1 NFAT5 NFATC1 NFATC2
 NFATC3 NFATC4 NFE2L2 NFE2L3 NFIA NFIB
 NFKB1 NFKB2 NFKBIANFKBIBNFKBIENFKBIL1 NFRKB NHS
 NISCH NKAIN2 NKX2-2 NKX2-5 NKX6-1 NLRC5 NLRP1 NLRP12
 NLRP3 NLRX1 NMNAT1 NMT2 NOD1 NOD2 NODAL
 NOG NOL12 NOL3 NOS1 NOSIAP NOS2 NOS2A
 NOS3 NOTCH1 NOTCH2 NOTCH3 NOTCH4
 NOX1 NOX3 NOX4 NPAS2 NPAS3 NPAT NPC1 NPC1L1
 NPC2 NPHS1 NPHS2 NPPA NPPB NPPC NPR2 NPR3
 NPSR1 NPY NPY1R NPY2R NPY5R NQO1 NR0B2 NR1D1
 NR1H2 NR1H3 NR1H4 NR1I2 NR2F2 NR3C1 NR3C2 NR4A1
 NR4A2 NR4A3 NR5A1 NR5A2 NRAS NRF1 NRG1 NRG3
 NRG4 NRM NRP1 NSMAF NSUN2 NT5DC1 NTM
 NTNG1 NTRK1 NTRK2 NUCB2 NUDT1 NUDT22 NUDT6
 NUP133 OAS1 OAS2 OAS3 OCA2 ODF3B OFD1 OGG1
 OGN OLFML2B OLIG3 OLR1 OMP OPCML OPRM1
 OR52I1 OS9 OSBP OSBP2 OSBPL11 OSBPL2 OSBPL7
 OSBPL9 OSM OST4 OTX2 P2RX4 P2RX7 P2RY1 P2RY11
 P2RY12 P2RY13 P2RY2 P4HB PADI4 PAFAH1B1 PAG1
 PALB2 PALLD PAN2 PANK4 PAPD1 PARD3 PARD6A
 PARK2 PARL PARP1 PARP15 PARP2 PARP3 PAX3 PAX4
 PAX6 PBEF1 PBX1 PBX2 PBX3 PCBD1 PCBP4 PCCA
 PCCB PCDH15 PCDH9 PCK1 PCK2 PCLO PCMT1
 PCNXL2 PCNXL3 PCSK1 PCSK2 PCSK4 PCSK5
 PCSK6 PCSK9 PCTP PCYT1BPDCD1 PDCD1LG2 PDCD2
 PDE10A PDE11A PDE1A PDE1B PDE2A PDE3A
 PDE3B PDE4A PDE4B PDE4C PDE4D PDE6A PDE6C PDE7A
 PDE7B PDE8A PDGFB PDGFC PDGFD PDGFRA PDGFRB
 PDIA2 PDK1 PDK4 PDSS2 PDX1 PDYN PDZK1 PDZK1IP1
 PEA15 Pebp1 PECAM1 PELO PEMT PENK PEPD
 PER2 PER3 PERP PEX1 PEX14 PEX7 PF4 PFKP
 PGAP3 PGD PGLYRP1 PGM1 PGM3 PGR PHACTR2
 PHACTR3 PHEX PHF12 PHOX2B PHTF1 PI4KA
 PIGF PIGO PIGR PIK3C2B PIK3C2G PIK3CA
 PIK3CB PIK3CD PIK3R1 PINK1 PIP4K2B PITX2 PKD2
 PKIG PKLR PKN1 PKN2 PKNOX2 PKPI PKP3
 PLA1A PLA2G10 PLA2G12A PLA2G15 PLA2G1B
 PLA2G2A PLA2G2D PLA2G4A PLA2G4B
 PLA2G4C PLA2G4D PLA2G4E PLA2G4F
 PLA2G5 PLA2G6 PLA2G7 PLAC4 PLAG1 PLAGL1 PLAT
 PLAU PLAUR PLCB2 PLCB3 PLCB4 PLCD1 PLCD3 PLCD4
 PLCG1 PLCH1 PLCL1 PLCZ1 PLD1 PLD2 PLEK PLEKHA1
 PLEKHB1 PLEKHH2 PLG PLGLB1 PLGLB2
 PLIN PLOD2 PLTP PLXNA4 PMP22 PMVK PNMT
 PNN PNPLA2 PNPLA3 PNPT1 PODN POFUT2
 POLD1 POLG POLG2 POLR2A POLR3A POMC
 PON1 PON2 PON3 POPDC3 POR POSTN POU2AF1
 POU2F2 PPAP2B PPARA PPARBP PPARD
 PPARG PPARGC1A PPARGC1B PPBP PPP1R14B
 PPP1R1A PPP1R1B PPP1R3A PPP1R9A
 PPP2R2B PPP2R2C PPP3CA PPP3CB

PPP3R1 PPP3R2 PPPDE2 PPRC1 PPT2 PPY PRCP
 PRDM2 PREP PREX1 PRF1 PRICKLE1 PRKAA1
 PRKAA2 PRKAB1 PRKAB2 PRKACB
 PRKAG1 PRKAG2 PRKAG3 PRKCB PRKCB1
 PRKCD PRKCDBP PRKCG PRKCH PRKCQ PRKCSH
 PRKCZ PRKD2 PRKG1 PRKRA PRLHR PRMT3 PRNP PROC
 PROCR PROK1 PROP1 PROX1 PROZ PRPF8 PRR5-ARHGAP8
 PRRT1 PRRT4 PRSS1 PRSS16 PRTN3 Psap PSEN1 PSEN2
 PSENEN PSMA6 PSMB1 PSMB10 PSMB8 PSMB9
 PSMD1 PSMD9 PSRC1 PTAFR PTBP1 PTCD3 PTCH1 PTEN
 PTER PTGDR PTGDS PTGER1 PTGER2 PTGER3
 PTGER4 PTGES PTGES2PTGFR PTGIR PTGIS PTGR1
 PTGS1 PTGS2 PTH PTH1R PTHLH PTK2B PTK6 PTPLA
 PTPN1 PTPN2 PTPN22PTPRC PTPRD PTPRF PTPRM PTPRN
 PTPRN2 PTPRO PTPRS PTX3 PUS7L PVRL2 PVRL3
 PVT1 PXMP3 PYGL PYY RAB15 RAB26 RAB5A RAB5B
 RABAC1 RACGAP1 RAD23A RAD9A RAF1
 RAG1 RAGE RALGPS1 RAMP2 RAMP3 RANBP17
 RAP2B RAPGEF1 RARA RARB RARG RARRES2
 RARRES3 RASAL2 RASGRP1 RAVER1 RBBP4
 RBBP7 RBBP8 RBM17 RBMS1 RBP1 RBP4 RDBP RDH5
 RECK REEP5 REEP6 REG1A REG1B REG3A REL RELA
 RELB REN RENBP REST RETN RFC1 RFC3 RFX2
 RGL3 RGPLD1 RGS1 RGS2 RGS3 RGS4 RGS7 RGS9
 RGS9BP RHBDF2 RHBG RHCE RHCG RHOA
 RHOQ RIC3 RILP RING1 RINL RIPK1 RIPPLY2
 RNASEK RNASEL RNF135 RNF157 RNF175 RNF216
 RNF220 RNF26 RNF5 RNF8 RNFT1 RNPEPL1 RNR1
 RNR2 ROCK1 ROCK2 ROR1 RORA ROS1 RPGRIP1L
 RPIA RPL10 RPL13A RPL18 RPL7A RPS19 RPS20 RPS6KA1
 RPS6KB1 RRP9 RSBN1 RSRC1 RTEL1 RUNDC3B
 RUNX1 RUNX2 RXFP1 RXRA RXRB RXRG RYR2 S100A6
 SIPR1 SIPR2 SIPR3 SAA1 SAA2 SAA4 SAMD4A
 SAMD4B SAMM50 SARM1 SARS SASH1 SBNO2
 SCAF1 SCAP SCAR2 SCARB1 SCARB2SCD SCD5 SCG5
 SCGB1A1 SCHIP1 SCMH1 SCN5A SCNN1A SCNN1B
 SCNN1D SCNN1G SCO1 SCO2 SCP2 SCUBE3
 SDC2 SDC4 SDCCAG8 SDF2 SDF4 SDHB SDHD
 SDR16C5 SDS SEBOX SEC16BSEL1L SELE SELL
 SELP SELPLG SELS SEMA3G SEMA4B
 SEMA5A SEMA5B SEMA6D SENP3 SEPX1
 SERP1 SERPINA1 SERPINA10 SERPINA12 SERPINA3
 SERPINA4 SERPINA5 SERPINA6 SERPINB2
 SERPINC1 SERPIND1 SERPINE1 SERPINF1
 SERPINF2 SETBP1 SEZ6L SFRS15 SFTA3 SFTPD SGCD
 SGK1 SGPP1 SGSM1 SH2B1 SH2B3 SH2D2A SH3GL3SHB
 SHBG SHMT2 SHPK SIAE SIDT2 SIGLEC12 SIN3B
 SIPA1 SIRT1 SIRT3 SIRT4 SKAP2 SKIV2L SKP2 SLAMF6
 SLC11A1 SLC11A2 SLC12A1 SLC12A3
 SLC12A4 SLC12A5 SLC13A3 SLC15A4
 SLC16A1 SLC16A3 SLC17A5 SLC19A1
 SLC19A2 SLC1A3 SLC1A7 SLC20A1 SLC22A1
 SLC22A12 SLC22A2 SLC22A3 SLC22A4
 SLC22A5 SLC23A3 SLC25A11 SLC25A21
 SLC25A27 SLC26A8 SLC27A1 SLC27A4
 SLC27A5 SLC29A1 SLC29A3 SLC2A1 SLC2A10
 SLC2A2 SLC2A4 SLC2A5 SLC2A9 SLC30A8 SLC35F3
 SLC39A11 SLC39A7 SLC3A2 SLC43A2 SLC45A2
 SLC46A1 SLC47A1 SLC47A2 SLC48A1
 SLC4A1 SLC4A2 SLC4A4 SLC5A10 SLC6A13 SLC6A14

SLC6A2	SLC6A4	SLC7A4	SLC7A8	SLC8A1	SLC8A2	SLC9A3	SLC9A3R1
SLCO1A2	SLCO1B1	SLCO4C1	SLFN12L				
SLIT2	SLN	SMAD1	SMAD3	SMAD4	SMAD5	SMAD6	SMARCA4
SMARCB1	SMG6	SMOC2	SMPD1	SMPD2	SMPD3	SMPD4	
SNAP23	SNAP25	SNCA	SND1	SNTG1	SOAT1	SOAT2	SOCS1
SOCS2	SOCS3	SOCS5	SOCS6	SOD1	SOD2	SOD3	SORBS1
SORCS1	SORL1	SOS1	SOS2	SOX2	SOX3	SOX6	SPAG17
SPARC	SPATS2L	SPEG	SPINK1	SPINK5	SPP1	SPRED1	
SPRN	SPTAN1	SPTLC3	SQLE	SRD5A1	SRD5A2	SREBF1	SREBF2
SRGAP2	SRI	SRR	SRSF6	SSBP4	SSPN	SSPO	SST
SSTR2	ST7	ST8SIA4	STAR	STARD10	STARD13		
STARD3	STARD3NL	STARD4	STARD5	STARD6	STARD8	STARD9	
STAT1	STAT2	STAT3	STAT4	STAT5B	STAT6	STC1	STK11
STK19	STK32C	STK33	STRA13	STRA6	STRN4	STX1A	STXBP3
STXBP4	SUMO1	SUMO4	SUOX	SUPT3H		SURF1	SURF2
SURF4	SV2B	SYCE2	SYN1	SYN2	SYN3	SYT7	SYT8
SYTL3	TAC1	TADA1L	TADA3	TAF1	TAF5L	TAGAP	
TAGLN	TAL1	TANK	TAP1	TAP2	TAPBP	TARS2	TAS1R2
TAS2R38	TBC1D1		TBC1D10C	TBCB	TBCCD1		
TBL2	TBP	TBX2	TBX21	TBX3	TBX4	TBX5	TBXA2R
TBXAS1	TCEA3	TCF1	TCF2	TCF20	TCF7	TCF7L2	TCN1
TCN2	TCP1	TCP11	TCTA	TDRD9	TEAD2	TEC	TECRL
TEP1	TERT	TF	TFAM	TFAP2B	TFB1M	TFB2M	TFCP2
TFPI	TFR2	TFRC	TG	TGFA	TGFB1	TGFB2	TGFB1
TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGM2	TGS1	TH		
THADA	THBD	THBS1	THBS2	THBS4	THEMIS	THOC6	
THPO	THRA	THRB	THRSP	TIE1	TIMELESS	TIMM8A	
TIMM8B	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TIMP4	TIRAP	TK1	
TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR7	TLR8	TLR9	TMBIM6
TMED10	TMEM117	TMEM132D	TMEM143				
TMEM161B	TMEM18	TMEM195	TMEM232				
TMEM38A	TMEM57	TMEM63A	TMEM70				
TMEM91	TMPO	TMTC1	TNF	TNFAIP1	TNFAIP2		
TNFAIP3	TNFRSF10A	TNFRSF10B	TNFRSF10D				
TNFRSF11A	TNFRSF11B	TNFRSF14	TNFRSF1A				
TNFRSF1B	TNFRSF25	TNFRSF6B	TNFRSF8				
TNFRSF9	TNFSF11	TNFSF12-TNFSF13	TNFSF13				
TNFSF15	TNFSF18	TNFSF4	TNFSF8	TNIP3	TNMD		
TNNC2	TNNI2	TNNI3	TNNI3K	TNNT1	TNNT2	TNNT3	TNS4
TNXB	TOMM40	TOP2B	TP53	TPH1	TPH2	TPM1	
TPM2	TPMT	TPO	TPT1	TRAF1	TRAF2	TRAF3	TRAF4
TRAF5	TRAF6	TRAK2	TRAP1	TREM1	TREM2	TRERF1	TRH
TRHDE	TRIB1	TRIB3	TRIM25	TRIM32	TRIM68	TRIOBP	TRIP11
TRMU	TRNA	TRNAL2	TRNC	TRNE	TRNF	TRNG	TRNH
TRNI	trnK	TRNK	TRNL1	TRNL2	TRNM	TRNN	TRNP
TRNQ	TRNR	TRNS1	TRNS2	TRNT	TRNV	TRNW	TRNY
TRPC1	TRPM2	TRPM6	TRPM7	TRPM8	TRPS1	TRPV1	TSC22D1
TSC22D3	TSEN15	TSHZ2	TSPAN1	TSPAN31	TSPAN8		
TSPAN9	TSTD1	TTC26	TTC39B	TTN	TPA	TTR	TUB
TUBA4A	TUBA8	TUBD1	TWF2	TXK	TXN	TXNIP	
TXNRD2	TYK2	TYMP	TYMS	TYRP1	UBASH3A		
UBC	UBE2C	UBE2D2	UBE2E2	UBE2N	UBE3C		
UBL5	UBQLN1	UBR1	UCP1	UCP2	UCP3	UGT1A1	
UGT1A10	UGT1A3	UGT1A4	UGT1A5				
UGT1A6	UGT1A7	UGT1A8	UGT1A9				
UGT2B4	UNC119B	UNC13B	UNC5A	UPBI			
UQCC	USF1	USF2	USH2A	USP35	USP9X	UTS2	UXS1
VAMP2	VAMP3	VAMP4	VAMP8	VARS	Vav1	VAV3	VAX2
VCAM1	VCL	VCP	VDR	VEGF	VEGFA	VEGFB	VEGFC
VEPH1	VGF	VHL	VKORC1	VLDLR	VPS11	VPS13B	

		VPS13C	VPS25	VPS39	VTI1A	VTI1B	VTN	VWF	WARS
		WDR20	WDR27	WDR41	WDR72	WDR76	WEE1	WFS1	WNK1
		WNK3	WNK4	WNT10B		WNT2	WNT2B	WNT5B	WRN
		WWC2	WWTR1	XIAP	XRCC1	XRCC3	XRCC6	XYLT1	XYLT2
		YY1	ZAN	ZAR1L	ZBTB16	ZBTB20	ZBTB38	ZBTB42	ZCCHC11
		ZDHH1	ZDHH2	ZDHH3	ZDHH4	ZDHH5	ZDHH6	ZDHH7	ZDHH8
		ZFAT	ZFH3	ZFH4	ZGPAT	ZMIZ1	ZMPSTE24		ZMYND8
		ZNF202	ZNF239	ZNF259	ZNF300	ZNF407	ZNF462	ZNF513	ZNF627
		ZNF678	ZNF680	ZNF7	ZNF76	ZNF776	ZNF92	ZNRF3	ZYX
Diabetes gestacional	ABCC8	ACE	ACP1	ADIPOQ		ADRB3	AGER	CAPN10	CAT
		CDKAL1		CDKN2A		CDKN2B		CYB5R4	CYP27B1
		CYP2R1	FOXC2	FTO	GCK	GHRL	HFE	HHEX	HLA-DQA1
		HLA-DQB1		HLA-DRB1		HLA-DRB2		HLA-DRB3	
		HLA-DRB5		HLA-DRB6		HLA-DRB9		HNF1A	HNF4A
		IDE	IGF1	IGF2BP2	IL10	INS	IPF1	IRS1	KCNJ11
		KCNQ1	LTA	MBL2	MED1	MICA	NEUROD1		PDX1
		PPARBP		PPARG	PPARGC1A		SERPINE1		SLC30A8
		TCF1	TCF20	TCF7L2	TNF	UTS2	WFS1		
	ACAA1	ACACB	ACE	ACE2	ACTN4	ADD1	ADD2	ADIPOQ	
Nefropatia		ADM	ADNP	ADRB1	AGER	AGT	AGTR1	AGTR2	AHSG
		AKR1B1	AKR1B10		ANKS1B		APEX1	APOA5	APOB
		APOC1	APOC3	APOE	AR	BDKRB1		BDKRB2	BID
		BMP2	BMP4	BMP7	CALD1	CAPN10		CARS	CASP12
		CASP3	CAT	CCL2	CCL5	CCR2	CCR5	CDH13	CDH22
		CETP	CFH	CFTR	CHN2	CMA1	CNDP1	CNDP2	COMT
		CPVL	CTGF	CTLA4	CYBA	CYP11B2		CYP27B1	
		CYP2R1	DCN	DDOST	DRD1	DRD2	DRD3	DRD4	EDN1
		ELMO1	ELMO2	ENPP1	ENTPD1		EPO	ESR1	FABP2
		FGB	FMN2	FRMD3	GCK	GFPT1	GFPT2	GHR	GHRL
		GNB3	GPX1	GREM1	GSTM1	GSTP1	GSTT1	HAS2	HAS3
		HFE	HLA-DQA1		HLA-DQB1		HLA-DRB1		HMCN1
		HMOX1	HNF1A	HNF1B	HNF4A	HP	HSD11B2		HSPA1A
		HSPA1B		HSPA1L	HSPB1	ICAM1	IGFBP1	IGFBP3	IL10
		IL1B	IL1R1	IL1RN	IL6	IL6R	IL8	INS	IRS2
		ITGA2	ITGA2B	KCNJ11	KCNQ1	KIRREL	KLRA1	KNG1	LGALS3
		LIPC	LMNA	LPL	LRRC7	LTA	MBL2	MCF2L2	
		MIA3	MIOX	MMP9	MPO	MTHFD1L		MTHFR	MTRR
		MYH9	NEUROD1		NFKB1	NOS1	NOS2A	NOS3	NOX1
		NOX4	NPHS1	NPHS2	NPPB	NPY	NQO1	PARK2	PARL
		PCBD1	PCSK1	PLEKHH2		PON1	PON2	PPARG	PPARGC1A
		PREX1	PRKCB1		PRKCSH		PSRC1	PVT1	RAGE
		REN	SDC2	SELP	SERPINE1	SEZ6L	SFRS15	SLC12A3	
		SLC12A5		SLC13A3		SLC22A1		SLC22A2	
		SLC22A3		SLC2A1	SLC2A2	SMAD1	SMAD3	SMAD4	SMAD5
		SOD1	SOD2	SOX2	SUMO4	TCF1	TCF2	TCF7L2	TGFB1
		TGFB1		TGFB2		TMPO	TNF	TNFRSF1A	
		TNFRSF1B		TP53	TRNL1	TRPC1	TSC22D1		UCP1
		UNC13B		VDR	VEGF	VEGFA	XYLT1	XYLT2	ZMIZ1
Neuropatia	ACE	ADH1B	ADIPOQ		ADRA2B		AGT	AGTR1	AGTR2
		AKR1B1	ALDH2	APOB	APOC3	APOE	C10orf2	CAPN10	CAT
		CTLA4	DRD3	GNB3	GPX1	GSTM1	GSTT1	HFE	HNF1A
		HNF1B	HP	HSPA1B		HSPA1L	LIFNG	IL10	LPL
		MIOX	MTHFR	NCALD	NOS1	NOS2A	NOS3	OPRM1	PARP1
		POLG	PPARG	SELE	SLC2A1	SOD2	SOD3	SUMO4	TCF1
		TCF2	TLR4	TNF	TNFRSF11B		TNFRSF1B		TRNL1
		UCP1	UCP2	UCP3	VDR	VEGFA			
	A2BP1	A2M	AATF	ABCA1	ABCB1	ABCB11	ABCB5	ABCC2	ABCC8
		ABCG2	ABCG5	ABCG8	ACAA2	ACACA	ACACB	ACAT2	ACE
Obesidade		ACLY	ACP1	ACSL5	ACSM1	ACSM2B		ACSM3	ACTN3
		ACVR1	ACVR1B		ACVR1C		ACVR2A		ACVR2B

GFPT1 GGH GGT1 GH1 GHR GHRH GHRHRGHRL
 GHSR GIP GIPR GJA4 GLIS3 GLP1R GNAQ GNAS
 GNB3 GNMT GNPDA2 GNRH1 GNRHRGPAM GPC5
 GPR50 GPRC5B GPX1 GRB14 GRIN1 GRLF1 GRXCR1
 GSDBMGSTK1 GSTM1 GSTP1 GSTT1 HADHAHAVCR1
 HBE1 HCRTR2 HDAC5 HERPUD1 HFE HGF
 HHEX HIF1A HIST1H1PS2 HIVEP1HK1 HLA-A HLA-B
 HLA-C HLA-DPA1 HLA-DPB1 HLA-DQA1 HLA-DQB1
 HLA-DRA HLA-DRB1 HMGA2HMGCR HMOX1
 HNF1A HNF1B HNF4A HP HRH1 HSD11B1 HSD17B1
 HSD17B2 HSD17B3 HSD17B4 HSD3B1
 HSD3B2 HSPA1A HSPA1B HSPA1LHSPA8
 HTR1A HTR1B HTR2A HTR2C HTR3A HTR3B HTR3C HTR3D
 HTR3E HTR5A HTR6 HYOU1 ICAM1 IDE IGF1 IGF1R
 IGF2 IGF2BP1 IGF2BP2 IGF2BP3 IGF2R
 IGFALS IGFBP1 IGFBP2 IGFBP3 IGFBP4 IGFBP5 IGFBP6 IL10
 IL10RA IL13 IL15 IL15RA IL18 IL18R1 IL1A IL1B
 IL1R1 IL1RL1 IL1RN IL2RA IL33 IL4 IL4R IL5RA IL6
 IL6R IL6ST IL8 INHA INHBA INHBB INHBC INHBE
 INPP1 INPPL1 INS INSIG1 INSIG2 INSR INSRP IPF1
 IRF6 IRS1 IRS2 ITGA2 ITGA2B ITGB2 ITGB3 IVNS1ABP
 JAK2 JAZF1 KAL1 KATNAL1 KCNJ11KCNQ1 KCTD15
 KIF2B KIF3A KIF6 KIR2DL1 KIR2DL3 KIR2DS4
 KISS1 KISS1R KLF14 KLF2 KLF7 KNG1 KRAS LCAT LCT
 LDLR LEFTY1LEFTY2LEP LEPR LEPROT LEPROTL1
 LGR5 LHB LHCGR LIF LIN28B LIN7C LIPC LIPE
 LIPF LIPG LMNA LOC100128354 LOC100129150 LOC387761
 LPA LPIN1 LPIN2 LPL LRGUKLRP4 LRP5 LRP6 LTA
 LTA4H LTC4S LTF LY6G5BLYPLAL1 LYZL1 MADD
 MAF MAOA MAOB MAPK14 MAPK9 MARK3 MBL2
 MBOAT4 MC1R MC2R MC3R MC4R MC5R MCHR1
 MCHR2 MEC2P2 MED12 MEF2C MEFV MEPE MFAP4 MFHAS1
 MGAT1 MGEA5 MGLL MICA MIF MKKS MKL2 MLH1
 MLLT7 MLXIPLMMAB MMP1 MMP3 MMP9 MPO MRPL9
 MS4A2 MSH2 MSH5 MSH6 MSRA MSTN MSX1 MSX2
 MTA1 MTA3 MTCH2 MTHFR MTMR9 MTNR1B MTR
 MTRR MTTP MVK MYB MYC MYO1C NAMPT NAP1L5
 NAPEPLD NAT1 NAT2 NBN NCAN NCOA3 NCOA6
 NCR3 ND1 ND2 ND3 ND4 ND4L ND5 ND6
 NDN NDOR1 NEDD4L NEGR1 NEK2 NEK4 NEU3
 NEUROD1 NFATC1 NFATC2 NFKB1 NFKB2
 NFKBIANFKBIL1 NGEF NKX2-1 NLRC5 NLRP5 NMB
 NMU NODALNOG NONO NOS1AP NOS2 NOS3
 NOTCH2 NOTCH4 NOX4 NPAS2 NPC1 NPC1L1
 NPFFR2 NPHP3 NPHS2 NPPA NPPB NPPC NPR3 NPY
 NPY1R NPY2R NPY5R NQO1 NR0B2 NR1H2 NR1H3 NR1H4
 NR3C1 NR3C2 NR4A2 NR5A1 NRXN3 NTRK2 OGG1 OPRD1
 OPRK1 OPRL1 OPRM1 OR2S2 OR4C6 OR4P4 ORMDL3
 OSBPL11 OTOL1 PADI4 PARD3 PBEF1 PBX4 PCBD1
 PCK1 PCM1 PCSK1 PCSK2 PCSK9 PDE10A PDE4D
 PDGFRA PDK1 PDX1 PDYN PDZK1 PECAM1
 PEMT PENK PER2 PER3 PEX2 PFKP PGM1 PGR
 PHF15 PHOX2B PIK3CAPIK3CBPIK3CGPIK3R1 PINK1
 PKLR PKN2 PLA2G7PLAT PLCB1 PLCG1 PLCL1 PLIN
 PLIN1 PLIN4 PLTP PMCH PMP22 PNMT PNPLA1
 PNPLA2 PNPLA3 PNPLA4 PNPLA5
 POF1B POLG POMC PON1 PON2 POU1F1 PPARA
 PPARD PPARG PPARGC1A PPARGC1B PPIE PPIF
 PPP1R3A PPP2CA PPP3CA PPP3CB
 PPP3CC PPT2 PPY PPYR1 PRC1 PRDX6 PRKAA2

	PRKACB	PRKAR1A	PRKAR1B	PRKAR2A	
	PRKAR2B	PRKCA	PRKG1	PRL	PRLHR PRLR PRNP
	PROK2	PROKR2	PROX1	PRRT1	PRSS23 PSRC1 PTCH1
	PTEN	PTER	PTGES2	PTGS2	PTH1R PTPN1 PTPN11 PTPN22
	PTPRA	PTPRD	PTPRF	PWRN1	PYY PYY2 RAC2 RAGE
	RAPGEF4	RARRES2	RASAL2	RBM6	RBP4 RDBP
	RELA	RET	RETN	RGS2	RGS6 RHEB RNASE4 RNASEL
	RNF5	RNR1	RNR2	ROBO1	ROCK1 RORC RPS6KA5
	RPS6KB1	RPTOR	RXRA	RXRB	RXRG S1PR5 SAP30BP
	SARS	SCAP	SCARB1	SCD	SCG3 SCG5 SCGB1A1
	SCNN1A	SDC3	SDCCAG8	SDF2	SEC16B SELE
	SELP	SELS	SERPINA12	SERPINA6	SERPINE1
	SH2B1	SH3BGR	SH3BGR	SH3PXD2B	SHBG
	SHC1	SHH	SIM1	SIRT1	SKOR2 SLC10A1 SLC12A7
	SLC22A1	SLC22A2	SLC25A12	SLC2A1	SLC2A12
	SLC2A2	SLC2A4	SLC2A6	SLC2A9	SLC30A8 SLC4A5 SLC6A14
	SLC6A2	SLC6A3	SLC6A4	SLC7A4	SLCO1B1 SLCO1B3
	SLCO2B1	SLIT3	SMAD1	SMAD2	SMAD3 SMAD4 SMAD5
	SMAD6	SMAD7	SMPD1	SNAI1	SNAP25 SNHG11 SOCS1
	SOCS3	SOCS7	SOD2	SORBS1	SORT1 SOST SOX6 SP7
	SPAST	SPSB3	SPTBN1	SRC	SRD5A1 SRD5A2 SREBF1 SREBF2 SRR
	SST	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4 SSTR5 ST3GAL6
	STAR	STARD3NL	STAT3	STCH	STEAP4 STK33 STX1A
	STXBP4	SULT1A1	SVIL	TACC1	TAS1R2 TAS2R38
	TAX1BP1	TBC1D1	TBCA	TBL2	TCF1 TCF20
	TCF7	TCF7L2	TCN2	TCOF1	TFAM TFAP2B TGFB1 TGFB2
	TGFB3	TGFBR1	TGFBR2	TGFBR3	TH
	THADA	THBS1	TIMELESS	TK1	TLE4 TLR2 TLR4
	TM7SF3	TMEM101	TMEM108	TMEM18	TMEM195
	TMEM38B	TMEM5	TNF	TNFAIP1	TNFRSF11A
	TNFRSF11B	TNFRSF13B	TNFRSF1A	TNFRSF1B	
	TNFSF11	TNKS	TNMD	TNXB	TP53 TPH1 TPH2
	TRA2B	TRAP	TRHR	TRIB1	TRIB3 TRIM66 TRNA TRNC
	TRNF	TRNG	TRNH	TRNI	TRNK TRNL1 TRNM TRNN
	TRNP	TRNQ	TRNR	TRNS1	TRNS2 TRNV TRNW TRNY
	TRPV1	TSC2	TSLP	TSPAN8	TTC39B TTC8 TUB UBL5
	UCN	UCP1	UCP2	UCP3	UGT1A1 UGT1A6
	UGT2B4	UGT2B7	USF1	USP2	UTS2R VCAM1
	VDR	VEGF	VEGFA	VGLL3	VIP VIPR2 VPS13C VTN
	VWF	WDR36	WDC1	WFS1	WLS WNT10B WNT5B
	WRN	WWOX	XBP1	XPA	XRCC1 ZBED3 ZBTB38 ZBTB40
	ZFAND6	ZNF483	ZNF71	ZPLD1	
Status pré-diabético	ADAMTS9	APPL	APPL1	ARNT	ATF6 BCL11A CAPN10
	CDC123	CTLA4	DCD	HLA-DQA1	HLA-DQB1
	HLA-DRB1	HNF4A	IL2RA	JAZF1	MBL2 NOTCH2
	NR4A3	PCSK1	PPARG	PTPN22	RBP4 TCF7L2 THADA TNF
	TSPAN8	VEGFA	WFS1		
Retinopatía	ABCA4	ACAA1	ACE	ADH1B	ADIPOQ ADORA2A ADRB3
	AGER	AGT	AGTR1	AGTR2	AKR1B1 AKR1B10 ALDH2
	APOC3	APOE	AR	ARHGAP22	CA1 CAPN10 CAT
	CCL2	CCR2	CCR5	CFH	CMA1 CTLA4 CXCL12 CYBA
	DDAH1	DDAH2	EDN1	EPO	FGF2 GNB3 GSTM1
	GSTP1	GSTT1	HFE	HIF1A	HLA-DQA1 HLA-DQB1
	HLA-DRB1	HP	HS6ST3	HTRA1	ICAM1 IGF1 IL1R1 IL6
	ITGA2	ITGA2B	ITGB2	LIPG	LMNA LPL LTA MIOX
	MMP2	MMP9	MTHFR	MTRR	MYSM1 NEUROD1 NFKB1
	NOS2	NOS2A	NOS3	NPY	PCSK1 PECAM1 PLXDC2
	PON1	PON2	PPARG	PPARGC1A	PRKCB PTPN1 PVT1
	RAGE	ROCK2	SDS	SELE	SERPINE1 SERPINF1
	SFRS15	SLC12A3	SLC2A1	SOD1	SOD2 SUMO4 TCF7L2

DM1

	TGFB1	TIMP3	TLR4	TNF	TRNL1	TSC22D1	UCP1
	UCP2	VDR	VEGF	VEGFA	VWF		
ABCC8	ABLM1	ABO	ACE	ACE2	ACP1	ACTN4	ADA
	ADAM33		ADAMTS9		ADD1	ADD2	ADIPOQ
	ADRB2	ADRB3	AGER	AGPAT1		AGT	AGTR1
	AHSG	AIF1	AIRE	AKR1B1	AKR1B10		ALDH2
	APOA4	APOB	APOC1	APOC3	APOE	APOM	AR
	ATP1A1	B4GALNT1		BACH2	BANK1	BAT1	BAT2
	BDKRB2		BDNF	BID	BMP2	BMP4	BMP7
	BTC	BTLA	BTN3A2	BTNL2	C10orf2	C12orf30	C14orf181
	C1QTNF6		C2	C2orf65	C5	C6orf10	C6orf25
	C6orf47	C8orf85	CACNA1D		CALD1	CAPSL	CARD15
	CARS	CAT	CBLB	CCL2	CCL21	CCNY	CCR2
	CCR5	CD14	CD226	CD274	CD28	CD38	CD40
	CD58	CD69	CDH13	CDK2	CDK6	CDKAL1	
	CDKN2B		CETP	CFB	CFH	CFTR	CHN2
	CLEC16A		CLEC1B		CLIC1	CNDP1	CNDP2
	COL11A2		CPVL	CTGF	CTLA4	CTSH	CTSL2
	CXCL10	CXCL12	CXCL9	CYBA	CYP11B2		CYP24A1
	CYP27B1		CYP2J2	CYP2R1	DAXX	DBP	DCN
	DDOST	DEFB1	DLK1	DMPK	DRD3	EGFL8	EIF4H
	ENPP1	EPO	ERAP1	ERBB3	ERVK7	F12	FAAH
	FAM135A		FAM167A		FBXO38		FCGR2A
	FCGR3A		FCRL3	FGB	FGF2	FMN2	FOXP3
	G6PC	G6PC2	GCK	GCLC	GHR	GIMAP5	
	GNB3	GPX1	GSC	GSDMB	GSTM1	GSTT1	HAVCR2
	HBB	HERC2	HFE	HFE2	HHEX	HIF1A	HLA-A
	HLA-C	HLA-DOA		HLA-DPA1		HLA-DPB1	HLA-DQA1
	HLA-DQA2		HLA-DQB1		HLA-DRA		HLA-DRB1
	HLA-DRB5		HLA-G	HMGCS2		HNFI1A	HNFI1B
	HSD11B2		HSPA1A		HSPA1B		HSPA1I
	IBD5	ICAM1	ICOS	ICOSLG	IDDM12		IDDM2
	IDDM4	IDDM5	IDDM8	IDE	IFIH1	IFNB1	IFNG
	IGF1	IGF2BP2		IKZF4	IL10	IL12A	IL12B
	IL12RB2		IL13	IL18	IL18RAP		IL19
	IL1B	IL1R1	IL1RAP	IL1RN	IL2	IL20	IL21
	IL23R	IL26	IL27	IL2RA	IL4	IL4R	IL6
	INSR	IPF1	IRF5	IRF8	IRS1	IRS2	ITGA2
	ITGB3	ITPR3	JAZF1	KCNJ11	KCNQ1	KIAA1109	KIF5A
	KIR2DL1		KIR2DL2		KIR2DL3		KIR2DL4
	KIR2DL5A		KIR2DL5B		KIR2DP1		KIR2DS1
	KIR2DS2		KIR2DS3		KIR2DS4		KIR2DS5
	KIR3DL1		KIR3DL2		KIR3DL3		KIR3DS1
	KIRREL	KLHDC1		KLRA1	KNG1	LAG3	LEP
	LGALS3	LIPC	LPAR3	LPL	LPP	LRRC7	LTA
	MBL2	MCF2L2		MIA3	MICA	MICB	MIF
	MOG	MS4A2	MSH5	MTHFD1L		MTHFR	MTRR
	NCR3	NDST3	NEUROD1		NEUROD2		NEUROG3
	NFKB1	NFKBIAN	NFKBIL1		NLRP1	NLRP3	NOD2
	NOS2A	NOS3	NOTCH2		NOTCH4		NPHS1
	NPPA	NPPB	NPY	NR2F2	NRP1	NUDT1	OAS1
	OAS3	OLIG3	OS9	PADI4	PAPD1	PARP1	PAX4
	PDCD1	PDCD1LG2		PDCD2	PDX1	PGM1	PHOX2B
	PHTF1	PIK3R1	PLAU	POFUT2		POLG	PON1
	PPARA	PPARD	PPARG	PPARGC1A		PPT2	PRF1
	PRKCQ	PRKCSH		PRRT1	PRSS16	PSMB1	PSMB8
	PTGER4		PTPN1	PTPN2	PTPN22	PTPRC	PTPRN
	PYGL	RAB5B	RAGE	RASGRP1		RBM17	RDBP
	REG1B	RETN	RGS1	RING1	RNF5	RNPEPL1	
	RSBN1	RUNX1	RXR	SCN5A	SEL1L	SELE	SELL
							SELS

	SERPINE1	SEZ6L	SH2B3	SIAE	SKAP2	SLC11A1	
	SLC22A1	SLC22A2		SLC22A3		SLC22A4	
	SLC22A5	SLC29A3		SLC2A1	SLC2A2	SLC30A8	
	SLC9A3R1	SLFN12L		SMAD1	SMAD3	SMAD4	SMAD5
	SMOC2	SOCS1	SOCS3	SOCS5	SOD1	SOD2	SOD3
	SORCS1	SOX2	SPINK5	SPP1	SREBF1	STAT3	STAT4
	SUMO4	SUOX	TADA1L	TAF5L	TAGAP	TAP1	TAP2
	TAPBP	TBP	TBX21	TCF1	TCF2	TCF20	TCF7
	TCF7L2	TDRD9	TG	TGFB1	TGFBR1	TGFBR2	TH
	THADA	TLR2	TLR3	TLR4	TMPO	TNF	TNFAIP3
	TNFRSF14	TNFRSF1A	TNFRSF1B	TNFRSF25	TNFRSF8		
	TNFRSF15	TNFRSF8	TNXXB	TP53	TRAF1	TRNL1	TRPC1
	TSPAN8	TXN	TYK2	UBASH3A	UCP1	UCP2	UCP3
	UNC13B	UTS2	VDR	VEGF	VEGFA	VWF	WDR72
	WFS1	XYLT1	XYLT2	ZDHHC1	ZFAND6	ZFAT	
	ZGPAT	ZMIZ1	ZNF300				
A2M	ABCA1	ABCA2	ABCA4	ABCA7	ABCB1	ABCB11	ABCB4
	ABCB8	ABCC1	ABCC3	ABCC4	ABCC5	ABCC8	ABCC9
	ABCG1	ABCG2	ABCG4	ABCG5	ABL2	ABLM1	ABO
	ACAA1	ACAA2	ACACA	ACACB	ACAD10	ACADL	ACADM
	ACADS	ACAN	ACAP3	ACAT2	ACE	ACE2	ACER3
	ACHE	ACN9	ACOT11	ACP1	ACSM1	ACSM3	ACSS2
	ACTA2	ACTC1	ACTL6	BACTN3	ACTN4	ACVRL1	ADA
	ADAD1	ADAM10	ADAM12	ADAM17	ADAM30	ADAM33	ADAMTS17
	ADAMTS9	ADAMTS1	ADAMTS3	ADAP2	ADCY3	ADCY5	ADCYAP1
	ADD1	ADD2	ADD3	ADH1A	ADH1B	ADH1C	ADIPOQ
	ADIPOR1	ADIPOR2	ADK	ADM	ADORA1	ADORA2A	ADORA2B
	ADORA3	ADRA1A	ADRA1B	ADRA1D	ADRA2A	ADRA2B	ADRA2C
	ADRB1	ADRB2	ADRB3	ADRBK1	ADRBK2	AFF1	AGBL5
	AGER	AGT	AGTR1	AGTR2	AGTRAP	AHCY	AH11
	AHSG	AIFM1	AIRE	AKAP10	AKNA	AKR1B1	AKR1B10
	AKT1	AKT2	AKT3	ALAS1	ALB	ALCAM	ALDH1L1
	ALDH2	ALDH7A1	ALMS1	ALOX12	ALOX15	ALOX5	ALOX5AP
	ALX4	AMAC1L2	AMBP	AMELX	AMOT	AMPD1	AMT
	ANAPC13	ANGPT4	ANGPTL3	ANGPTL4	ANK2	ANKRD13D	ANKRD27
	ANKRD40	ANKRD52	ANKRD60	ANKS1A	ANKS1B	ANO1	ANP32A
	ANXA1	ANXA2	ANXA4	AP3B1	AP3S1	APAF1	APBB1
	APC	APC2	APITD1	APLN	APOA1	APOA2	APOA4
	APOA5	APOB	APOBEC1	APOC1	APOC2	APOC3	APOC4
	APOD	APOE	APOH	APOL1	APOLD1	APOM	APOO
	APP	APPL1	AQP1	AQP10	AQP2	AQP3	AQP7
	AR	ARF3	ARG1	ARHGAP4	ARHGAP6	ARHGAP8	ARHGEF1
	ARHGEF11	ARHGEF12	ARHGEF5	ARL15	ARL6	ARMC9	ARMS2
	ARNT	ARNTL	ARNTL2	ARSB	ART3	ASAH1	ASCC3
	ASF1B	ASIP	ASPSCR1	ASS1	ASTL	ATAD3B	ATAD5
	ATF1	ATF2	ATF3	ATF6	ATF6B	ATG9B	ATIC
	ATM	ATOH8	ATP13A1	ATP13A3	ATP1A1	ATP1A2	ATP1B1
	ATP2A2	ATP2B1	ATP2B2	ATP5O	ATP6	ATP6AP1	ATP6V0D1
	ATP6V1B1	ATP6V1D	ATP6V1G2	ATP8	ATP8B2	ATPBD4	ATRIP
	ATXN3	AUTS2	AVEN	AVPR1A	AVPR2	AXIN1	AXL
B2M	B3GALT6	B3GAT2	B3GNT9	BACE2	BACH2	BAD	BAG1
	BAG3	BAG4	BAG5	BAHD1	BAI3	BAK1	BAT1
	BAT3	BAT4	BAX	BAZ1B	BBS2	BCAR3	BCAS3
	BCAT1	BCDIN3D	BCHE	BCKDK	BCL11A	BCL2	BCL2A1
	BCL2L10	BCL2L12	BCL2L14	BCL2L2	BCL7B	BCL9	BCMO1
	BCO2	BDKRB1	BDKRB2	BDNF	BGLAP	BHLHE40	BHLHE41
	BHMT	BHMT2	BID	BIK			

GTPBP3 GTSE1 GYS1 GYS2 GZMH HABP2 HACE1
 HADH HAS2 HAS3 HAVCR1 HAVCR2 HBB
 HBEGF HCFC1 HCFC1R1 HCN2 HCN4 HCRTR2
 HDAC10 HDAC2 HDAC4 HDAC5 HDAC6 HDAC7 HDAC8
 HDAC9 HDLBP HEBP1 HERC2 HES7 HEXB HFE HFE2
 HGF HHEX HHIP HIF1A HINFP HIRA HIVEP3 HK1
 HLA-A HLA-B HLA-C HLA-DMA HLA-DMB HLA-DOA
 HLA-DPA1 HLA-DPB1 HLA-DQA1 HLA-DQB1
 HLA-DRA HLA-DRB1 HLA-G HMBS HMGA1 HMGA2
 HMGCR HMGCS2 HMHA1 HMOX1 HNF1A HNF1B
 HNF4A HNRNPA1 HNRNPH2 HNRNPUL1 HP
 HPGD HPGDS HPR HPX HRASLS2 HRG HRH1
 HRH2 HSD11B1 HSD17B4 HSD17B8 HSD3B1
 HSD3B2 HSF4 HSH2D HSP90AA1 HSP90AB1
 HSP90B1 HSPA12B HSPA1A HSPA1B
 HSPA1LHSPA4 HSPA8 HSPB7 HSPG2 HTR1B HTR2A HTR2B
 HTR2C HTR3A HTR3B HTR3D HTRA1 HYMA1 HYOU1 IAPP
 IARS2 ICAM1 ICAM3 ICAM4 ICAM5 ICOSLGID3 IDDM2 IDE
 IDS IFIH1 IFNA1 IFNAR1 IFNAR2 IFNB1 IFNG IFNGR1
 IFNGR2IGF1 IGF1R IGF2 IGF2AS IGF2BP1 IGF2BP2
 IGF2BP3 IGF2R IGFBP1 IGFBP2 IGFBP3 IGFBP6 IGHV3-75
 IHH IKBKAPIKBKE IKZF2 IL10 IL10RA IL10RB IL11RA
 IL12A IL12B IL12RB1 IL12RB2 IL13 IL13RA1
 IL15 IL16 IL17C IL17F IL17RB IL18 IL1A IL1B
 IL1F10 IL1F5 IL1F6 IL1R1 IL1R2 IL1RAP IL1RAPL1
 IL1RN IL2 IL20RA IL21 IL23R IL2RA IL2RB IL3 IL4
 IL4R IL5 IL5RA IL6 IL6R IL6ST IL7 IL8 IL9
 ILF3 IMMP1L INMT INPP1 INPP4B INPP5DINS
 INSIG1 INSIG2 INS-IGF2 INSR IPCEF1 IPF1 IQCK
 IQGAP2IRAK1 IRAK2 IRAK3 IRAK4 IRF3 IRF5 IRS1
 IRS2 IRS4 IRX4 ISCA2 ISG15 ISL1 ISPD ITGA1
 ITGA2 ITGA2B ITGA4 ITGAL ITGAM ITGAV ITGB1 ITGB2
 ITGB3 ITGB4 ITGB5 ITGB6 ITGBL1 ITLN1 ITLN2 ITPKB
 ITPR2 ITPR3 JAG1 JAK1 JAK2 JAK3 JAM3 JAZF1
 JMJD7 JMJD7-PLA2G4B JUN KCNA1 KCNA10
 KCNA5 KCNC1 KCNE1 KCNE2 KCNE3 KCNH2 KCNH4 KCNH7
 KCNH8 KCNIP1 KCNJ1 KCNJ10 KCNJ11 KCNJ15 KCNJ2 KCNJ9
 KCNK2 KCNK4 KCNMB1 KCNQ1 KCNQ3 KCNQ5 KCTD12
 KCTD15 KDR KHK KIAA0664 KIAA0748
 KIF11 KIF5A KIFC3 KIR2DL1 KIR2DL3 KIR2DS4
 KIRREL2 KITLG KL KLC1 KLC3 KLF1 KLF10
 KLF11 KLF12 KLF13 KLF15 KLF16 KLF2 KLF3 KLF4
 KLF5 KLF6 KLF7 KLF8 KLHDC1 KLHL29KLK1
 KLK15 KLK2 KLK3 KNG1 KRR1 KSR2 L1CAM L3MBTL4
 LACE1 LAMA1 LAMA5 LAMC3 LAMP2 LAMP3 LARS2 LBH LBP
 LBR LCAT LCORL LCPI LCT LDLR LDLRAP1
 LEFTY1 LEP LEPR LEPROT LGALS1 LGALS2 LGALS3
 LGR5 LIF LIG1 LILRB1 LILRB3 LIN28B LIN7C LIPA
 LIPC LIPE LIPF LIPG LLGL1 LMAN1 LMNA LMNB1
 LMNB2 LMOD1 LMX1A LOC100127899 LOC100127913
 LOC100127944 LOC100127946 LOC100128095 LOC100128994
 LOC100129500 LOC100129619 LOC100129623 LOC100129652
 LOC100129720 LOC100129857 LOC100130116 LOC100130288
 LOC100130476 LOC100130859 LOC100131311 LOC100131540
 LOC100131646 LOC100131673 LOC100131774 LOC100131778
 LOC100131909 LOC100132839 LOC100133070 LOC100133511
 LOC100133949 LOC100134017 LOC100286880 LOC100286919
 LOC100286983 LOC100287002 LOC100287015 LOC100287123
 LOC100287132 LOC100287133 LOC100287143 LOC100287174
 LOC100287206 LOC100287237 LOC100287239 LOC100287253

	LOC100287255	LOC100287264	LOC100287322	LOC100287376
	LOC100287380	LOC100287391	LOC100287398	LOC100287415
	LOC100287442	LOC100287504	LOC100287550	LOC100287611
	LOC100287659	LOC100287661	LOC100287744	LOC100287761
	LOC100287770	LOC100287776	LOC100287805	LOC100287830
	LOC100287870	LOC100287972	LOC100287976	LOC100287997
	LOC100288045	LOC100288047	LOC100288068	LOC100288077
	LOC100288128	LOC100288133	LOC100288152	LOC100288183
	LOC100288204	LOC100288205	LOC100288213	LOC100288270
	LOC100288312	LOC100288344	LOC100288346	LOC100288353
	LOC100288387	LOC100288400	LOC100288432	LOC100288449
	LOC100288457	LOC100288535	LOC100288545	LOC100288581
	LOC100288589	LOC100288722	LOC100288791	LOC100288795
	LOC100288810	LOC100288912	LOC100288941	LOC100288985
	LOC100288992	LOC100289003	LOC100289010	LOC100289011
	LOC100289065	LOC100289107	LOC100289130	LOC100289153
	LOC100289223	LOC100289233	LOC100289235	LOC100289251
	LOC100289309	LOC100289314	LOC100289329	LOC100289398
	LOC100289437	LOC100289447	LOC100289461	LOC100289552
	LOC100289577	LOC100289609	LOC100289982	LOC100290016
	LOC100290084	LOC100290144	LOC100290264	LOC100290498
	LOC100290634	LOC100290665	LOC100290747	LOC100290913
	LOC100291014	LOC100291029	LOC100291317	LOC100291596
	LOC100291664	LOC100291860	LOC100291870	LOC100292018
	LOC100292080	LOC100292100	LOC100292154	LOC100292257
	LOC100292270	LOC100292381	LOC100292420	LOC100292463
	LOC100292503	LOC100292519	LOC100292553	LOC100292696
	LOC100292782	LOC100292825	LOC100293006	LOC100293050
	LOC100293186	LOC100293322	LOC100293352	LOC100293367
	LOC100293428	LOC100293435	LOC100293499	LOC100293622
	LOC100293638	LOC100293689	LOC100293737	LOC100293959
	LOC100293975	LOC100294096	LOC100294106	LOC100294113
	LOC100294116	LOC100294128	LOC100294135	LOC100294146
	LOC100294154	LOC100294156	LOC100294159	LOC100294163
	LOC100294183	LOC100294184	LOC100294185	LOC100294187
	LOC100294192	LOC100294209	LOC100294213	LOC100294218
	LOC100294219	LOC100294220	LOC100294223	LOC100294225
	LOC100294248	LOC100294257	LOC100294262	LOC100294268
	LOC100294270	LOC100294271	LOC100294274	LOC100294279
	LOC100294309	LOC100294311	LOC100294312	LOC100294315
	LOC100294319	LOC100294358	LOC100294369	LOC100294372
	LOC100294386	LOC100294416	LOC100294438	LOC100294439
	LOC100294450	LOC284889	LOC285501	LOC387761
	LOC400682	LOC644662	LOC645722	LOC647055
	LOC729526	LOC729991	LOC729991-MEF2B	LOC730011
	LOC732146	LOC732419	LPA	LPAR1 LPCAT2LPIN1
	LPIN2	LPL	LPXN	LRGUK LRP1 LRP2 LRP5 LRP6
	LRP8	LRPAP1	LSM2	LSP1 LSS LST1 LTA LTA4H LTB
	LTBP4	LTC4S	LUC7L	LUM Lvis1 LY6G5BLY6G6CLY96 LYN
	LYPD5	LYRM4	LZIC	MACF1 MADD MAF Mageb1 MAGI2
	MAML1	MAN2A1	MAOA	MAOB MAP1D MAP2 MAP2K5
	MAP2K6	MAP3K1	MAP3K3	MAP3K5
	MAP3K6	MAP4K2	MAP4K3	MAP7 MAPK1
	MAPK11	MAPK12	MAPK13	MAPK14
	MAPK7	MAPK8	MAPKAP1	MAPKAPK3 MAPKBP1 9-
Mar	MARS	MAS1	MASP2	MAT1A MAT2A MAT2B MATN2 MBL2
	MBTPS1	MC2R	MC3R	MC4R MC5R MCF2L2
	MCHR1	MCL1	MCM10	MCM8 MDGA2 Mdm4 MECF2 MED1
	MED12L	MED22	MED23	MEF2A MEF2B MEF2C MEF2D
	MEFV	MEIS1	Meis2	MEN1 METTL1 MFAP1 MFAP3

PODN	POFUT2	POLD1		POLG2	POLR2A	POLR3A		
POMC	PON1	PON2	PON3	POPDC3	POR		POSTN	
POU2AF1	POU2F2		PPAP2B		PPARA		PPARD	
PPARG	PPARGC1A	PPARGC1B		PPBP	PPP1R14B			
PPP1R1A	PPP1R1B		PPP1R3A		PPP1R9A			
PPP2R2B	PPP2R2C		PPP3CA		PPP3CB			
PPP3R1	PPP3R2	PPPDE2		PPRC1	PPY	PRCP	PREP	
PREX1	PRICKLE1	PRKAA1		PRKAA2		PRKAB1		
PRKAB2	PRKAG1		PRKAG2		PRKAG3			
PRKCB	PRKCB1	PRKCD		PRKCDBP	PRKCG			PRKCQ
PRKCZ	PRKD2	PRKG1	PRKRA	PRLHR	PRMT3	PROC	PROCR	
PROK1	PROP1	PROX1	PROZ	PRPF8	PRR5-ARHGAP8	PRRT4		
PRTN3	Psap	PSEN2	PSMA6	PSMB10	PSMB8		PSMB9	
PSMD1	PSMD9	PSRC1	PTAFR	PTCD3	PTCH1	PTEN	PTER	
PTGDR	PTGDS	PTGER1		PTGER2		PTGER3		
PTGER4	PTGES		PTGES2	PTGFR	PTGIR	PTGIS	PTGR1	
PTGS1	PTGS2	PTH	PTH1R	PTHLH	PTK2B	PTK6	PTPLA	
PTPN1	PTPN2	PTPN22	PTPRC	PTPRD	PTPRF	PTPRM	PTPRN2	
PTPRO	PTPRS	PTX3	PUS7L	PVRL2	PVRL3	PVT1	PXMP3	PYY
RAB15	RAB26	RAB5A	RABAC1	RACGAP1		RAD23A		
RAD9A	RAF1	RAG1	RAGE	RALGPS1		RAMP2	RAMP3	
RANBP17	RAP2B		RAPGEF1		RARA	RARB	RARG	
RARRES2	RARRES3		RASAL2		RAVER1	RBBP4		
RBBP7	RBBP8	RBMS1	RBP1	RBP4	RDH5	RECK	REEP5	
REEP6	REG1A	REG1B	REL	RELA	RELB	REN	RENB	
REST	RETN	RFC1	RFC3	RFX2	RGL3	RGPD1	RGS1	
RGS2	RGS3	RGS4	RGS7	RHBDF2	RHBG		RHCE	
RHCG	RHOA	RHOQ	RIC3	RILP	RING1	RINL	RIPK1	
RIPPLY2	RNASEK		RNF135		RNF157	RNF175	RNF216	
RNF220	RNF26	RNF8	RNFT1	RNPEPL1		RNR1	RNR2	
ROCK1	ROCK2	ROR1	RORA	RPGRIP1L		RPIA	RPL10	
RPL13A	RPL18	RPL7A	RPS19	RPS20	RPS6KA1		RPS6KB1	
RRP9	RSRC1	RTEL1	RUNDC3B		RUNX1	RUNX2	RXFP1	
RXRA	RXRB	RXRG	RYR2	S1PR1	S1PR3	SAA1	SAA2	
SAA4	SAMD4A		SAMD4B		SAMM50		SARM1	
SARS	SASH1	SBNO2	SCAF1	SCARB1	SCARB2	SCD	SCD5	
SCG5	SCGB1A1		SCHIP1	SCMH1	SCN5A	SCNN1A		
SCNN1B	SCNN1D		SCNN1G		SCO1	SCO2		
SCP2	SCUBE3		SDC2	SDC4	SDCCAG8		SDF2	
SDF4	SDHB	SDHD	SDR16C5		SDS	SEBOX	SEC16B	
SEL1L	SELE	SELL	SELP	SELPLG		SEMA3G		
SEMA4B		SEMA5A		SEMA5B		SEMA6D		
SEN3	SERP1	SERPINA1		SERPINA10		SERPINA12		
SERPINA3		SERPINA4		SERPINA5		SERPINA6		
SERPINB2		SERPINC1		SERPIND1		SERPINE1		
SERPINF1		SERPINF2		SETBP1		SEZ6L	SFRS15	SFTA3
SFTPD	SGCD	SGK1	SGSM1	SH2B1	SH2B3	SH2D2A		
SH3GL3		SHBG	SHMT2	SHPK	SIAE	SIDT2	SIGLEC12	
SIN3B	SIPA1	SIRT1	SIRT3	SIRT4	SKAP2	SKIV2L	SKP2	
SLAMF6		SLC11A1		SLC11A2		SLC12A1		
SLC12A3		SLC12A4		SLC12A5		SLC13A3		
SLC15A4		SLC16A1		SLC16A3		SLC17A5		
SLC19A1		SLC19A2		SLC1A3		SLC1A7	SLC20A1	
SLC22A1		SLC22A2		SLC22A5		SLC23A3		
SLC25A11		SLC25A21		SLC25A27		SLC26A8		
SLC27A1		SLC27A4		SLC27A5		SLC29A1		
SLC2A1	SLC2A10	SLC2A2		SLC2A4	SLC2A5	SLC2A9	SLC30A8	
SLC35F3		SLC39A11		SLC39A7		SLC3A2	SLC43A2	
SLC45A2		SLC46A1		SLC47A1		SLC48A1		
SLC4A1	SLC4A2	SLC4A4	SLC5A10		SLC6A13		SLC6A14	

SLC6A2 SLC6A4 SLC7A8 SLC8A1 SLC8A2 SLC9A3 SLC01A2
 SLC01B1 SLC04C1 SLIT2 SLN SMAD3 SMAD4
 SMAD6 SMARCA4 SMARCB1 SMG6 SMPD1 SMPD2
 SMPD3 SMPD4 SNAP23 SND1 SNTG1 SOAT1 SOAT2 SOCS1
 SOCS2 SOCS3 SOCS6 SOD1 SOD2 SOD3 SORBS1 SORCS1
 SORL1 SOS1 SOX6 SPAG17 SPARC SPATS2L SPEG
 SPINK1 SPINK5 SPP1 SPRED1 SPRN SPTAN1 SPTLC3
 SQLE SRD5A1 SRD5A2 SREBF1 SREBF2 SRF SRGAP2 SRI
 SRR SRSF6 SSBP4 SSPN SSPO SSTR2 ST7 ST8SIA4
 STAR STARD10 STARD13 STARD3 STARD3NL
 STARD4 STARD5 STARD6 STARD8 STARD9 STAT1 STAT2 STAT3
 STAT4 STAT5B STAT6 STC1 STK11 STK19 STK32C STK33
 STRA13 STRA6 STRN4 STX1A STXBP3 STXBP4 SUMO1 SUMO4
 SUPT3H SURF1 SURF2 SURF4 SV2B SYCE2 SYN1
 SYN2 SYN3 SYT7 SYT8 SYTL3 TAC1 TADA3 TAGLN
 TAL1 TANK TAP1 TAP2 TARS2 TAS1R2 TAS2R38
 TBC1D1 TBC1D10C TBCB TBCCD1 TBL2
 TBX2 TBX3 TBX4 TBX5 TBXA2RTBXAS1 TCEA3 TCF1
 TCF2 TCF20 TCF7 TCF7L2 TCN1 TCP1 TCP11 TCTA
 TDRD9 TEAD2 TEC TECRL TEPI TERT TF TFAM
 TFAP2B TFB1M TFPI TFR2 TFRC TGFA TGFB1 TGFB2
 TGFB1 TGFB1 TGFB2 TGFB3 TGM2
 TGS1 TH THADA THBD THBS1 THBS2 THBS4 THEMIS
 THOC6 THPO THRB THRSP TIE1 TIMELESS TIMM8A
 TIMM8B TIMP1 TIMP2 TIMP3 TIMP4 TIRAP TK1
 TLR2 TLR4 TLR5 TLR7 TLR8 TLR9 TMBIM6
 TMED10 TMEM117 TMEM132D TMEM143
 TMEM161B TMEM18 TMEM195 TMEM232
 TMEM38A TMEM57 TMEM63A TMEM70
 TMEM91 TMPO TMTC1 TNF TNFAIP2 TNFAIP3
 TNFRSF10A TNFRSF10B TNFRSF10D TNFRSF11A
 TNFRSF11B TNFRSF1A TNFRSF1B TNFRSF6B
 TNFRSF9 TNFSF11 TNFSF12-TNFSF13 TNFSF13
 TNFSF18 TNFSF4 TNIP3 TNMD TNNC2 TNNI2 TNNI3K
 TNNT1 TNNT2 TNNT3 TNS4 TNXB TOMM40 TOP2B
 TP53 TPH1 TPH2 TPM1 TPM2 TPMT TRAF1 TRAF2
 TRAF3 TRAF6 TRAK2 TRAP1 TREM1 TREM2 TRERF1 TRH
 TRHDE TRIB1 TRIB3 TRIM25 TRIM32 TRIM68 TRIOBP TRIP11
 TRMU TRNA TRNC TRNE TRNF TRNG TRNH trnK
 TRNK TRNL1 TRNM TRNN TRNP TRNQ TRNR TRNS1
 TRNS2 TRNT TRNV TRNW TRNY TRPC1 TRPM2 TRPM6
 TRPM7 TRPM8 TRPS1 TRPV1 TSC22D1 TSC22D3
 TSEN15 TSHZ2 TSPAN1 TSPAN31 TSPAN8 TSPAN9 TSTD1
 TTC26 TTC39B TTN TTR TUB TUBA4A TUBA8
 TUBD1 TWF2 TXK TXN TXNIP TXNRD2 TYMP
 TYMS TYRP1 UBC UBE2C UBE2D2 UBE2E2
 UBE2N UBE3C UBR1 UCP1 UCP2 UCP3 UGT1A1
 UGT1A10 UGT1A3 UGT1A4 UGT1A5
 UGT1A6 UGT1A7 UGT1A8 UGT1A9
 UGT2B4 UNC119B UNC5A UPB1 UQCC USF1
 USH2A USP35 USP9X UTS2 UXS1 VAMP2 VAMP3 VAMP4
 VAMP8 VARS Vav1 VAV3 VAX2 VCAM1 VCL VCP
 VDR VEGF VEGFA VEGFB VEGFC VEPH1 VHL VLDLR
 VPS11 VPS13B VPS13C VPS25 VPS39 VTN VWF WARS
 WDR20 WDR27 WDR41 WDR76 WEE1 WFS1 WNK1 WNK3
 WNT10B WNT2 WNT2B WNT5B WRN WWC2 XIAP
 XRCC1 XRCC3 XRCC6 YY1 ZAN ZAR1L ZBTB16 ZBTB20
 ZBTB38 ZBTB42 ZCCHC11 ZDHHC1 ZDHHC24
 ZFAND5 ZFAND6 ZFAT ZFHx4 ZGPAT ZMIZ1
 ZMPSTE24 ZMYND8 ZNF202 ZNF239 ZNF259 ZNF300

ZNF407 ZNF462 ZNF513 ZNF678 ZNF680 ZNF7 ZNF76 ZNF776
 ZNF92 ZNRF3 ZYX

ANEXO I

Integrative analysis of the transcriptome profiles observed in type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus primarily reveals the role of inflammation mediated by dendritic cells and macrophages

Evangelista AF¹; Collares CVA^{1,2}; Xavier DJ¹; Macedo C¹; Manoel-Caetano F¹; Rassi DM¹; Foss-Freitas MC²; Foss MC²; Sakamoto-Hojo ET^{1,3}; Nguyen C⁴; Puthier D⁴; Passos GA^{1,5}; Donadi EA^{1,2}

1) Molecular Immunogenetics Group, Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

2) Division Clinical Immunology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

3) Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters, (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

4) INSERM U928-TAGC, Aix-Marseille Université IFR137, Marseille, France

5) Disciplines of Genetics and Molecular Biology, Department of Morphology (DMEF), Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ABSTRACT

Background: Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease, while type 2 (T2D) and gestational diabetes (GDM) are considered metabolic disturbances. We performed a transcriptome analysis of peripheral mononuclear blood cells obtained from T1D, T2D and GDM patients and used a module map approach to compare their demographical, clinical, laboratory and treatment data against modulated genes that have been annotated by databases containing information regarding both GWAS and gene expression signatures displayed by immune cells. **Patients and Methods:** Samples from 56 (19 T1D, 20 T2D, and 17 GDM) patients were hybridized to whole genome one-color Agilent 4x44k microarrays. Non-informative genes were filtered by partitioning, and differentially expressed genes were obtained by rank product analysis. Functional analyses were carried out using the DAVID software, and module maps were constructed using the Genomica tool. **Results:** Our functional analyses were able to discriminate between T1D and GDM patients based on genes involved in inflammation. Module maps of differentially expressed genes revealed that modulated genes exhibited transcription profiles typical of macrophage and dendritic cells, that modulated genes had been previously associated with diabetic complications by association and meta-analysis studies and that disease duration, obesity, number of gestations, glucose serum levels and the use of medications, such as metformin, influenced the gene expression profile in at least one type of diabetes. **Conclusion:** This is the first module map study to show the influence of epidemiological, clinical, laboratory, immunopathogenic and treatment features on the transcription profiles of T1D, T2D and GDM patients.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is considered by the World Health Organization to be a global epidemic. Although the different kinds of diabetes have varying incidence rates, it is estimated that approximately 6.4% of the world adult population has some type of diabetes (<http://www.idf.org/diabetesatlas/>). Diabetes is characterized as hyperglycemia resulting from a relative or absolute impairment of insulin secretion as well as peripheral resistance to insulin [1]. Based on etiology, diabetes mellitus has been classified into type 1 diabetes (T1D), type 2 diabetes (T2D), gestational diabetes mellitus (GDM), as well as other types of diabetes, including genetic defects in β -cell function, genetic defects in insulin action, diseases of the exocrine pancreas, endocrinopathies, drug- or chemical-induced forms, infection-induced diabetes, uncommon forms of immune-mediated diabetes, and other genetic syndromes sometimes associated with diabetes [1]. The pathogenic mechanisms of each diabetes type are still unclear, especially in the case of T2D and GDM. Pregnant women with gestational diabetes also have an increased risk of developing T2D, suggesting a close relationship between these types [2][3][4].

T1D is the most studied type of diabetes, has several susceptibility *loci* identified in mice (*Idd1-Idd26*) and is characterized by the autoimmune destruction of pancreatic beta cells leading to insulin deficiency [5]. Macrophages, dendritic cells and lymphocytes are involved in this pathogenic process through a complex interplay of mechanisms implicated in the loss of immune tolerance to autoantigens, including i) the hypoexpression of insulin in the thymus during promiscuous antigen expression [5][6]; ii) autoantigen presentation mediated by molecules coded by the *HLA-DRB1*04-DQB1:03:02* and *HLA-DR31*03-DQB1*02:01* haplotypes resulting in the development of insulin autoantibodies (IAA) and auto-antibodies against the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GADA), respectively [7]; iii) a deregulation of the immune response mediated by either an impaired expression of surface regulatory molecules (*IL2*, *IL2RA*, *IL2RB*, and *CTLA-4*) or a deregulation of intracellular signals (*PTPN2* and *PTPN22*) [8]; iv) a decreased number of suppressive or T regulatory cells [9]; v) a decreased number of iNKT cells [10]; and vi) a loss of function of molecules involved in the innate immune response [11][12]. In addition, several other genes have been implicated in the development of T1D by human genome wide association studies (GWAS) [13][14][15], including genes identified by transcriptome analyses in human or animal models [16][17] that evaluated peripheral blood mononuclear cells [18][19], pancreatic beta cells [20] and whole blood cells [21].

In recent years, genetic mechanisms have also been shown to affect the development of T2D [22]. Several studies have associated polymorphisms in the *PPARG* and *KCNJ11* genes with T2D susceptibility [23]. Other studies have identified a strong effect of *TCF7L2* gene variants on T2D risk, possibly affecting proglucagon expression with consequent reduced insulin secretion [23][24]. Indeed, both GWAS and international collaborative efforts to analyze GWAS data from multiple groups, such

as the Meta-Analysis of Glucose and Insulin-related traits Consortium (MAGIC), have identified other genetic variants associated with T2D gene susceptibility [25][26][27][28], several of which were associated with glycemic traits. Many of these groups of genes were related to abnormal insulin processing (*MADD*), higher proinsulin and lower insulin secretion (*TCF7L2*, *SLC30A8*, *GIPR*, and *C2CD4B*), and abnormalities in early insulin secretion (*MTNR1B*, *FADS1*, *DGKB*, and *GCK*) [22]. Although GWAS have identified susceptibility regions across the genome and transcriptome studies have indicated several modulated genes in many chromosomes [29][30][31], functional studies are still needed to understand the role of these genes.

The pathogenesis of T1D has been considered to be very different from that of T2D, and information obtained by GWAS has indicated that most T1D and T2D genetic loci do not overlap. However, there is evidence that inflammatory processes involving interleukin-1 may play a role in islet beta cell loss in both types of diabetes [32]. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) energy metabolism has been found to play a major role in the pathogenesis of insulin resistance, which shows an important link between inflammation and metabolic regulation [33]. In addition, there is increasing evidence that metabolic regulation in these cells could influence the number of PBMCs, proliferation pathways, molecular basal synthesis and leukocyte function [34]. In accordance with these findings, transcriptome studies comparing T1D with T2D [35] and T1D with a control group [18] have revealed changes in the expression of several genes that have roles in inflammatory response, fatty acid biosynthesis, hydrolase activity, detoxification of aldehydes generated by alcohol metabolism and lipid peroxidation, all of which could affect the metabolism of PBMCs in diabetic patients.

Compared with T1D and T2D, GDM has been subject to fewer linkage studies and transcriptome analyses [36]. Many genes, however, are known to be associated with both GDM and T2D, especially those related to obesity and oxidative stress [37][38]. The mechanisms linking excess adiposity to an elevated risk of GDM are not completely understood, but recent evidence points to the role of specific hormones and cytokines known as adipokines, which are secreted by the adipose tissue [39][40]. In addition, transcriptome signatures obtained from placenta [41] and whole blood cells [42] have identified genes involved with lipid metabolism that are differentially expressed between T1D and GDM. Recently, in a meta-analysis of the transcription profiles of T1D, T2D and GDM patients, our group reported that gene expression signatures of GDM patients were closer to those of T1D patients than to T2D [43]. The analyses of gene expression signatures, however, were impaired by the presence of multiple variables associated with each type of diabetes. To circumvent these problems, here we used several bioinformatics tools to analyze demographical, clinical, laboratory and treatment data against modulated genes that have been annotated by databases containing information regarding both GWAS and gene expression signatures displayed by immune cells. This type of comparison has yielded multiple informative modules that have been used to perform comprehensive maps in cancer [44], and here we apply these tools to diabetes.

MATERIAL AND METHODS

Study Population

We studied 56 adult diabetic patients, 19 presenting T1D (7 women/12 men) with ages of 18-36 years, 20 presenting T2D (13 women/7 men) with ages of 41-72 years and 17 presenting gestational diabetes with ages of 23 to 40 years. For our analysis, we used the mean age of the three groups (37 years with SD $\pm$ 14). The mean length of disease was 11 ± 5.3 years, while the mean values of glucose and Hb1Ac levels were 130.7 mg/dL and 8.9 with SD $\pm$ 1.8, respectively. For gestational diabetes patients, the mean period of gestation was 30.5 with SD $\pm$ 5.7 weeks, and the mean number of pregnancies was 2 ± 1 per patient. T1D and GDM patients were treated only with insulin, while T2D patients were treated with insulin in combination with metformin, captopril, aspirin, atorvastatin and hydrochlorothiazide. All patients underwent follow-up examinations at the Outpatient Clinics of the Division of Endocrinology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of Sao Paulo, Brazil. The exclusion criteria were based on recent episodes of ketoacidosis, active nephropathy, proliferative retinopathy, diabetic foot syndrome, high HDL levels and diagnosed cardiovascular diseases. Figure 1 shows a schematic heatmap with all demographic, clinical and laboratory patient features. The study protocol was approved by the local Ethics Committee (Protocol # 9153/2008).

Blood Collection, Peripheral Mononuclear Cell Isolation and RNA Extraction

A total of 20 mL of peripheral blood was collected and used for the isolation of PBMCs by discontinuous gradient density centrifugation on a Ficoll-Hypaque cushion (Sigma, St. Louis, MO). Total RNA was extracted using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations and ratios were checked using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE), and the RNA integrity was assessed by microfluidic electrophoresis using a 2100 Bioanalyzer and RNA 6000 nanochips (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). We used only samples that exhibited median RNA integrity number (RIN) ≥ 9.0 .

Oligo Microarrays

Hybridizations onto whole human genome 4x44K oligo microarrays (G4112F, Agilent) were performed using the one color (Cy3) Quick Amp labeling kit (Agilent). Briefly, 500 ng of total PBMC RNA plus spike-in controls were reverse transcribed into double stranded cDNA. The primers used for this reaction contained many consecutive thymine bases attached to a T7 promoter that paired at the 5' end of the first strand of cDNAs. Next, the T7 polymerase was added along with nucleotides labeled with fluorescent cyanine-3 (Cy3) dye, which amplified the anti-sense complementary RNAs (cRNA). The cRNAs were purified and then hybridized to the microarray for 17 hours at 65°C. After washing, the slides were scanned using a DNA Microarray Scanner with SureScan High-Resolution Technology (Agilent). A complete file providing microarray data from all samples used in this study, as well as the

numerical quantitative data and experimental conditions, is available on line at the MIAME public database (<http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>) through the following accession numbers: T1D (E-MEXP-3348), T2D (E-MEXP-3287) and GDM (E-MEXP-3349).

Data Quantification and Normalization

Data quantification and quality control were analyzed using the Feature Extraction (FE) software version 10.7 (Agilent Technologies). Expression data were loaded into an R-environment (<http://www.r-project.org>) using the AgiND package, a tool developed by the Technologies Avancées pour le Genome et la Clinique (INSERM U928, Marseille, France). The AgiND tool is available by request (<http://tagc.univ-mrs.fr/welcome/spip.php?rubrique194>). The background adjustment was performed by subtracting median background values from the median expression values obtained by FE and then converting the results to log-scale. For each sample, any negative values observed were replaced by randomly selected small positive values. After log-transformation, quantile normalization was applied to the data.

Statistical analysis

The Density Based Filtering and Markov Clustering (DBF-MCL) algorithm implemented in the Rtools4TB bioconductor package was used to extract sets of co-regulated genes from our microarray dataset [45]. DBF-MCL is a tree-step adaptive algorithm that finds genomic elements and genes located in dense areas, uses selected items to construct a graph and finally creates a partitioning graph using the Markov Clustering Algorithm (MCL). A 10% false discovery rate (FDR) was used as the limit for significance.

Principal Component Analysis (PCA) was carried out using the Ade4 R package [46]. Differentially expressed genes were identified using the R package RankProd [47]. Although the non-parametric rank product method does not make any assumptions about the data distribution, it can provide frequency ranking scores at each data point and is thus a robust tool for creating ranking lists. Genes were considered significantly expressed when they presented p-values and percentage of false positive predictions (PFP) smaller than 0.001 and 0.05, respectively. This test was used to perform paired analysis between T1D *versus* GDM, T2D *versus* GDM and T1D *versus* T2D.

Module-Map Construction

Significant and differentially expressed genes obtained by the use of DBFMCL and Rank Products were initially clustered using the Cluster 3.0 software [48]. Then, module maps were constructed using an ensemble of tools provided by the Genomica software [44], which searches for higher-order modules of gene sets and samples. Initially, this algorithm uses gene sets to annotate genes that were up-regulated (or down-regulated) by at least 1.0-fold. The algorithm then creates an FDR-corrected hypergeometric distribution ($p < 0.05$, $FDR < 0.05$) that compares the modulated genes

with array sets, including groups of compartmentalized genes, and organizes them into modules (module maps) discriminating variable-specific gene patterns according to patient features.

Module map array set variables

The variables used to create the experimental sets included demographic parameters (age and gender), clinical variables (disease duration, obesity, duration and number of gestations), laboratory data (serum glucose and glycated hemoglobin levels), and treatment features (use of hypoglycemics such as insulin, metformin or other drugs). All input variables were transformed into binary data (0 or 1), according to the nature of the variable, i.e., qualitative variables were assigned by the absence or presence of the characteristic, and quantitative variables were assigned by values below or above the mean values. The variables used included age, time of disease, gender, serum glucose and glycated hemoglobin values (Hb1Ac), use of insulin, use of metformin, use of any other type of medication, obesity, gestation time (for GDM patients) and number of gestations (for GDM patients) (Figure 1).

Module map gene set variables

Immune cell specific gene sets were obtained by re-analyzing raw data from the ImmGen project (http://www.immgen.org/index_content.html) (the detailed procedure is provided as supplementary material). Disease-related gene sets were obtained from GWAS integrator and Phenopedia. GWAS integrator is a compilation of genes offered by GWAS catalogs and databases such as HapMap, SNAP and Hugenavigator [49]. All of the information about genes related to T1D and T2D were considered for use in this study. Phenopedia is an available database about genetic association studies and meta-analysis summarized in the Human Genome Epidemiology (HuGE) encyclopedia (<http://hugenavigator.net/HuGENavigator/startPagePhenoPedia.do>). Lists of genes can be obtained about specific diseases or related complications [50]. The available lists of genes related to diabetes mellitus include those associated with pre-diabetic status, diabetes, type 1 diabetes, type 2 diabetes, gestational diabetes, diabetic complications, obesity, angiopathy, ketoacidosis, nephropathy, neuropathy and retinopathy.

Functional analysis

All clusters of co-regulated genes were analyzed by functional analysis using the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) version 6.7. This approach was used to identify significant biological processes and pathways represented by the differentially expressed genes [51]. A biological process or pathway was considered to be significant if it contained a minimum of three genes per category featuring score values less than 0.05 including the Benjamini-Hochberg correction. Moreover, we selected Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Biocarta categories provided by DAVID analysis (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) to explore complete biological processes and pathways.

RESULTS

In summary, the global partitioning analysis of the three types of diabetes disclosed 8,469 transcripts (available at www.rge.fmrp.usp.br/passos/DBF-MCL) and patient similarity by PCA as well as DAVID functional categories are shown (Figure 2 and 3). The statistical analysis by rank products comparing groups of patients yielded 2,704 (T1D versus T2D), 2,758 (T2D versus GDM) and 1,526 (T1D versus GDM) genes (Figure 4) as well as multiple significant DAVID functional categories (Figure 5). The module maps encompassing all analyses, i.e., genes obtained from both partitioning and rank products, were created with the set of genes obtained in each of the approaches described above (Figure 6).

Global analysis of the data set with density-based filter and Markov clustering (DBF-MCL)

A list of 8,469 genes obtained from global partitioning analysis (DBF-MCL method applying a non-informative filter) was clustered into 19 groups of co-regulated genes. A figure showing all clusters is available at www.rge.fmrp.usp.br/passos/DBF-MCL. Overall, many gene expression profiles are shared between T1D and GDM. A typical example of this analysis can be observed in cluster #1 (2,569 genes), in which all T2D patients shared a group of induced genes encoding zinc finger proteins, while these same genes were found repressed in T1D and GDM patients. Similarly, in cluster #12 (111 genes), all T2D patients shared a group of repressed genes associated with the inflammatory response, cytokine and chemokine activity, NOD-like receptors, signaling pathways, apoptosis regulation, regulation of nitric oxide biosynthetic processes, regulation of IL-6 production, regulation of NFκB and regulation of MAPKKK cascade (Figure 2).

The PCA graphs of the genes implicated by the DBF-MCL analysis showed similarity between some T1D and GDM patients (Figure 3A). We evaluated the influence of each of the 19 clusters on the general gene expression patterns by individually deleting each of the 19 clusters in several different orders. The only cluster that exhibited a strong influence on patient gene expression signature was cluster #12, which included many genes related to inflammatory response. Using this strategy, the gene expression profile of each patient clustered most patients according to their type of diabetes, as shown in Figure 3B.

Supervised analysis of T1D, T2D and GDM patients

To understand the influence of demographic, clinical and laboratory features on the differential gene expression profiles among diabetes patients, a second strategy was used. Module maps were created by comparing the three groups at the same time (from the partitioning analysis) as well as by the individual two by two group comparisons. These paired analysis module maps were constructed based on the results obtained from statistical analyses of rank products and are represented in Venn diagram format (Figure 4), disclosing 472 differentially expressed genes in T1D patients,

1,128 genes in T2D, 502 genes in GDM, and 228 genes shared by all three groups. The functional categories of these genes are shown in Figure 5.

T1D patients presented several genes that were induced when compared to GDM patients, including genes in the MHC region, TNF receptors (*TNFRSF17*, *TNFAIP6*), cytokines (*IL1A*, *IL-1B*, *IL1F10*, *IL4*, *IL6*, *IL8*, *IL23A*, *IL27*) and cytokine receptors (*IL1R2*, *IL1R1N*, *IL18R1*), chemokines (*CXCL1*, *CXCL2*, *CCL20*, *CCL23*, *CCL3L3*, *CCL4*) and chemokine receptors (*CCR3*, *CRL2*), lymphocyte receptors (*KIR3DL2*, *KIR2DS4*), and transcription factors (*GLIS2*, *SOX8*, *GATA2*, *RUNX1*, *SOD2*, *FOXC1*, *FOXC2*, *FOXE1*). Additionally, T1D patients presented several genes that were differentially expressed compared to T2D patients, including immune response genes, as MHC region genes (*HLA-DQA1* and *DQA2*, *HLA-DQB1*), toll-like receptors (*TLR5*, *TLR6*, *TLR7*, *TLR10*, *CARD9*), clusters of differentiation genes (*CD164*, *CD180*), cytokines (*IL2*, *IL7*, *IFNG*) and cytokine receptors (*TNFSF14*, *TNFAIP1*, *TNFAIP8L2*, *TNFSF10*), chemokines (*CCL15*) and chemokine receptors (*CCR8*, *CCR2*) and transcription factors (*FOXJ1*).

GDM patients presented several genes that were induced compared to T1D patients, including toll-like receptors (*TLR6*, *TLR7*), carbohydrate binding genes (*LGALS3*, *LGALS12*, *CLEC7A*, *CLEC1B*), plasma membrane receptors (*IL5RA*, *CCR1*), MHC genes (*HLA-DRB3*), solute carrier family genes (*SLC6A10P*, *SLC6A4*, *SLC1A5*, *SLC4A1*, *SLC8A1*, *SLC6A17*, *SLC16A3*, *SLC6A8*, *SLC14A1*), cluster of differentiation genes (*CD9*, *CD33*, *CD36*), and chemokines (*CXCL5*, *CCL15*, *CXCL12*, *CXCL10*). In contrast, GDM patients presented several genes that were induced compared to T2D, including immune response genes (*CXCL10*, *CXCR4*, *CD46*, *CCL3L3*, *IL1B*, *IL1A*, *NFKBIZ*, *IL27*, *C1QA*, *CD83*, *C1QB*, *HIF1A*, *DEFA4*, *DEFA3*, *KIR2DL4*, *CXCL1*, *CCL3*, *TNF*, *CCR1*, *CXCL3*, *CXCL2*, *CCL4*, *CCL23*, *CCL20*, *IL6*, *CR2*, *IL8*, *IL1RN*, *STAT3*, *CD55*) and genes involved in the response to hormone stimulus (*PTGS2*, *LDLR*, *PGF*, *PDGFA*, *PTGS1*, *NOS3*, *ADAM9*, *EGR2*, *SOCS2*, *SOCS3*, *RXRA*, *ADIPOR1*, *GAL*, *JUNB*, *C1QB*, *RETN*, *ADM*, *SORT1*, *CAV2*, *CAV1*, *TNF*, *GRB2*, *ERBB3*, *GNG11*, *BCL2L1*, *PIK3R1*, *IL6*, *IL1RN*, *STAT1*, *STAT3*, *CDKN1A*, *BMP7*, *IGFBP2*).

T2D patients presented several genes that were differentially expressed compared to T1D patients, including groups of genes related to transcription (*RARA*), numerous zinc finger proteins and genes regulating transcription (*MYOD1*, *EGR1*, *EGR2*, *LEF1*, *HES1*, *OSM*, *HIF1A*, *PIAS2*, *TCF7L2*, *SEC14L2*, *MAML2*, *NR4A2*, *NR4A1*, *ILF3*, *NEUROG3*, *NR4A3*, *ETS1*, *ETS2*, *BMP6*). Finally, the comparison between T2D and GDM showed multiple genes induced in T2D patients, including genes involved in DNA-binding, as zinc finger (*ZNF582*, *ZNF250*, *ZNF184*, *ZNF181*, *ZNF775*, *ZNF773*, *ZNF248*, *ZNF397*, *ZNF578*, *ZNF442*, *ZNF443*) and *FOXO3A*.

Comprehensive functional analysis using a module map approach

To identify the influence of patient features (array and experimental sets) on gene information (gene sets), we constructed several module maps, stratifying patients according to demographic,

clinical, laboratory and genetic characteristics. We used specialized databases associated with diabetes complications (Phenopedia), gene clusters associated with diabetes obtained from linkage studies (GWAS), and separate immune cell types associated with the pathogenesis of diabetes (ImmGen Project). The selection of modules of interest was based on our hypergeometric statistics and yielded several maps. The most relevant modules are shown (Figure 6).

GDM patients exhibited up-regulated genes observed in diabetes complications (including angiopathy) and in macrophages. Obesity, number of gestations per patient and gestation time were associated with the induction of diabetic complications as well as with macrophage gene profiles. Interestingly, a history of 2 or more gestations was positively associated with the modulation of T2D genes (Phenopedia). T1D patients exhibited induced genes typical of those displayed by dendritic cells and repressed genes typical of those presented by B-lymphocytes. In addition, T1D patients exhibited induction of genes related to diabetes nephropathy. The use of insulin did not influence gene expression patterns in T1D patients; however, increased serum glucose level was associated with the induction of genes related to diabetic retinopathy. In patients with T2D, the disease itself as well as the use of metformin was associated with the repression of genes implicated in obesity and diabetic complications. In contrast, genes found by T2D GWAS were associated with genes induced in T2D patients. Male patients with that had T2D for 11 or more years were at increased risk of neuropathy. The heatmap shown in Figure 6A illustrates these results.

In the paired analysis of T1D and GDM patients, both obesity and a history of two or more gestations were positively associated with T2D development and with diabetic complications in GDM patients. Conversely, in T1D patients, these variables were negatively associated. Additionally, in T1D patients, the use of insulin prevented diabetic complications (Figure 6B). In the paired analysis of T2D and GDM, the number of gestations was positively associated with genes related to diabetic complications and macrophage gene expression. In T2D patients, the use of metformin was negatively associated with complications (Figure 6C). The paired analysis of T1D and T2D patients showed genes associated with T2D and with obesity in T1D patients (Figure 6D).

DISCUSSION

Diabetes mellitus is one of the most studied diseases, and a large amount of information is available in the public databases regarding genetic association, meta-analysis and associated complications. Few studies, however, have systematically compared the major types of diabetes in terms of gene expression profiles at the genomic level. In this study, we performed an integrative analysis of the transcriptome profiles of the major types of diabetes using several bioinformatics tools. The major innovation of this study was the construction of informative module maps integrating epidemiologic, clinical, laboratory, pathogenetic, genetic, and molecular factors implicated in diabetes

to identify individual and shared features in T1D, T2D and GDM. In addition, this study clarified our previous data on the relatedness of the transcriptomes of GDM and T1D patients [43].

The major finding of our global partitioning analysis that examined the differences in transcription among each diabetes patient was the cluster of genes associated with inflammation. The high expression levels of these genes in some T1D and GDM patients seem to influence the global gene expression pattern of diabetic patients. Indeed, several important molecular mechanisms identified by clustering account for an intricate array of inflammation pathways. One important finding was the up-regulation of many mediators of the NOD-like signaling pathway. It has recently been suggested that NOD-like receptors can be induced by hyperglycemia and oxidative stress products, which could link metabolism and inflammation, particularly through the participation of *IL1B* [52]. In this study, many genes involved in these pathways were discovered to be induced in T1D and GDM patients, including *NLRP3* (an important receptor of the NOD-like pathway), *IL1B*, *CXCL1*, *CXCL2*, *IL6*, *IL8*, *TNF*, *RIPK2*, *TNFAIP3* and *NFKB1A*. *TNF* and *IL1B* are strongly involved in the regulation of nitric oxide biosynthetic processes [53] and are regulated by SOD2 (also induced in T1D and GDM) [54]. In addition, other upregulated genes including chemokines (*CCL3*, *CCL4*), cytokines (*IL6*, *IL8*, *TNF*) and transcription factors (*NFKB1A*, *MAPK8*) are involved with other inflammatory processes, such as toll-like and NFκB signaling pathways, apoptosis regulation, the MAPKKK cascade, and regulation of IL-6 production. Curiously, genes associated with these processes were down-regulated in T2D compared with the other types of diabetes. To understand this result, we took advantage of the rank product analysis (paired analyses), which showed particular features of the involvement of these inflammatory pathways in each type of diabetes. The comparisons between T2D and GDM as well as between T1D and T2D revealed several interesting results. At the same time that NOD-like receptors were induced in T1D and GDM, hundreds of zinc finger protein genes were induced in T2D. Additionally, drug treatment with metformin in T2D patients influenced the gene expression patterns, whereas insulin treatment did not. As literature findings have indicated that the expression of transcription factors associated with T2D can be induced by hypoglycemics, it is possible to hypothesize that these drugs may induce alterations in the normal T2D expression profile. Finally, the comparisons between T2D and T1D reveal the important genes associated with T2D diabetes, particularly transcription factors involved in glucose homeostasis (*TCF7L2*) [24][55], induction of NAD⁺ (*FOXO3*) [56] and regulation of cellular and systemic response to hypoxia (*HIF1A*) [57].

To further understand the close similarity between the transcription profiles in T1D and GDM, we examined the paired comparisons between these types. T1D patients exhibited modulation of genes in the MHC region, including the induction of *HLA-DQA1* and *HLA-DQA2* in T1D and the induction of the *HLA-DRB3* genes in GDM. The *DQA* gene encodes the alpha chain of the HLA-DQ heterodimeric molecule. HLA-DQ is non-covalently associated with DQβ, which has been associated

with T1D susceptibility in multiple populations [58][59][60][61]. In contrast, few studies have associated any HLA class II genes, including *HLA-DRB3* genes, with GDM [62]. Although a role of HLA class II genes in T1D pathogenesis has not yet been established, decreased surface expression of HLA-DQ molecules on CD4 and CD8 peripheral cells has been reported in recently diagnosed T1D patients exhibiting *DQB1* susceptibility alleles. This finding was attributed to the instability of these molecules on the cell surface [63]. As none of our patients were recently diagnosed, it is interesting to observe that the expression of MHC molecules is still modulated even after the disease has been present for long periods of time. On the contrary, there is also evidence that humoral responses to autoantigens may be driven by the *HLA-DQA1* genes even in recently diagnosed patients [64]. MHC susceptibility alleles associated with T1D (*DQA1**05:01, *DQB1**02:01/*DQB1**03:02) are different from those associated with GDM [65]. In addition to MHC genes, T1D patients also showed different levels of the killer immunoglobulin-like receptor (*KIR3DL2* and *KIR2DS4*) family genes compared with GDM patients (*KIR2DL4*). There are no gene expression studies implicating KIRs in diabetes. These findings suggest that the close similarity of the T1D and GDM transcription profiles may be due to the overall inflammatory gene patterns observed in both conditions, including the modulation of several genes primarily involved with the innate immune response.

Previously, the construction of module maps for cancer patients has revealed important modules that characterize different cancer lineages [44], allowing the identification of cancer biomarkers. Major findings regarding each group of diabetes patients are discussed below, including epidemiological, clinical, laboratory, genetic and pathogenetic features.

In all module maps in which the gene profile of GDM was compared with other types of diabetes, we observed an up-regulation of genes typically expressed by macrophages. These macrophage genes were co-regulated with those appearing in diabetic complications such as angiopathy and retinopathy, including the *IL1B* and *CCR1* genes, as seen in Figure 6A, 6B and 6C. As we also observed that increased glucose levels were associated with the development of retinopathy, it is possible that the effect of high glucose levels on macrophages might be involved in the creation of GDM complications. Moreover, GDM patients exhibited gene profiles similar to those reported for obesity (data available in the Phenopedia public data banks), and the majority of patients in our study were overweight. It is also interesting to observe that obesity, two or more gestations per patient, and gestations lasting over 30 weeks exhibited the same modules of induced genes in GDM patients, as observed in Figure 6A. Additionally, in GDM patients, having two or more gestations was positively associated with the development of T2D. Indeed, it is important to note that obese GDM patients have an increased risk of developing T2D [3]. This information is important for future studies of GDM.

In T1D patients, we observed a positive association with the profile reported for dendritic cells (Immungen) (Fig. 6A), particularly in patients exhibiting long-term disease (Fig 6D). As dendritic cells play an important role in antigen presentation via MHC class II molecules and as MHC class II genes are also induced in long-term T1D patients, it is possible to hypothesize that abnormal antigen presentation (foreign or self) is a chronic phenomenon in T1D. In contrast, T1D patients also exhibited a repression of genes associated with B1a and B1b lymphocytes (naïve B cells), in which the B1a lymphocyte subtype (CD5+) has been associated with the production of natural and autoantibodies [66]. Unfortunately, there is no public data regarding the gene pattern of activated B cells. Another important finding is the similarity of T1D gene expression profiles with that observed for diabetes nephropathy (Phenopedia). As no patients in our analysis exhibited clinical nephropathy, it may be valuable to further study the particular patients exhibiting nephropathy related gene patterns.

Finally, T2D patients exhibited gene expression profiles that were in disagreement with those reported in the public databases (Phenopedia) for diabetic complications (Figure 6C). Considering that half of our T2D patients exhibited higher median glucose levels than our T1D and GDM patients, one could expect to find the induction of genes associated with diabetic complications. As the T2D patients were treated with many types of medications besides hypoglycemics, it is possible that this intriguing and unforeseen finding may be a consequence of these treatments. Another possible explanation may be related to inflammation genes, which were down-regulated in T2D compared to T1D and GDM patients. The coupling of inflammation and drugs used to treat T2D might be responsible based on these findings. Indeed, the use of metformin and other medications (aspirin, captopril, atorvastatin, and hydrochlorothiazide) seems to modulate the expression of a large number of genes (Figure 6C and 6D), possibly affecting the inflammation status of T2D patients. Some of the down-regulated genes observed in T2D patients being treated with several drugs included *IL1B*, *IL4*, *IL8*, *CCL2*, *TNF* and *IFNG*. All of these genes are involved in inflammation and are also modulated in macrophages (data not shown). However, we cannot disregard the participation of the inflammatory pathway in T2D, as genes that participate in the NOD-like pathway probably also play a role in T2D [52]. Recent findings have shown that the down-regulation of *FOXO1* expression in macrophages blocks lipid accumulation in these cells, affecting many processes [67]. In our analysis, *FOXO3A* was also down-regulated in T2D patients compared to GDM. Both *FOXO1A* and *FOXO3A* genes are mediators of the same signaling pathway, AMPK, which can be activated as a consequence of long-term metformin use [56].

In conclusion, our analysis revealed that T1D and GDM exhibited a similar up-regulation of inflammatory genes. Major module maps revealed that epidemiological, clinical, laboratory, immunological, genetic and treatment features influenced the transcriptome profiles in the major types of diabetes. In addition, inflammation associated with macrophage and dendritic cell function may be

responsible for clustering GDM and T1D patients together, while inflammation in T2D may be influenced by drug treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We thank Dr. Pascal Rihet and the members of TAGC/INSERM-U928 for important suggestions in this study. We also thank the ImmGen project members for the kind donation of immune cells raw microarray data.

Author Contributions

Wrote the paper: AFE GAP DP EAD. Conceived the study and participated in its design and coordination: AFE GAP CN DP EAD. Provided material and analytical tools: ETSH GAP CN DP EAD. Performed patient selection, sample collection and cell separation: AFE DJX DMR. Responsible for diabetic patient's treatment and clinical information data: MCFF MFF. Performed RNA extraction and sample quality control: AFE DJX. Responsible for hybridization and acquisition of microarray data: AFE DJX CCVA FMC CM. Performed data analysis: AFE DP. All authors contributed to and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. American Diabetes Association.: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011, 34 Suppl 1:S62-6910.2337/dc11-S062.
2. Lauenborg J, Hansen T, Jensen DM, Vestergaard H, Mølsted-Pedersen L, Hornnes P, Loch H, Pedersen O, Damm P: Increasing incidence of diabetes after gestational diabetes: a long-term follow-up in a Danish population. *Diabetes Care* 2004, 27:1194-1199.
3. Lauenborg J, Grarup N, Damm P, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Pedersen O, Hansen T: Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009, 94:145-15010.1210/jc.2008-1336.
4. Bellamy L, Casas J-P, Hingorani AD, Williams D: Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009, 373:1773-177910.1016/S0140-6736(09)60731-5.
5. Chentoufi AA, Binder NR, Berka N, Abunadi T, Polychronakos C: Advances in type I diabetes associated tolerance mechanisms. *Scand. J. Immunol.* 2008, 68:1-1110.1111/j.1365-3083.2008.02120.x.
6. Tisch R, Wang B: Dysregulation of T cell peripheral tolerance in type 1 diabetes. *Adv. Immunol.* 2008, 100:125-14910.1016/S0065-2776(08)00805-5.
7. Knip M, Siljander H: Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* 2008, 7:550-55710.1016/j.autrev.2008.04.008.
8. Todd JA: Etiology of type 1 diabetes. *Immunity* 2010, 32:457-46710.1016/j.immuni.2010.04.001.
9. Sia C: Replenishing Peripheral CD4(+) Regulatory T Cells: A Possible Immune-Intervention Strategy in Type 1 Diabetes? *Rev Diabet Stud* 2006, 3:102-10710.1900/RDS.2006.3.102.
10. Novak J, Lehuen A: Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine* 2011, 53:263-27010.1016/j.cyto.2010.11.001.
11. Cipolletta C, Ryan KE, Hanna EV, Trimble ER: Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes. *Diabetes* 2005, 54:2779-2786.
12. Karumuthil-Melethil S, Perez N, Li R, Vasu C: Induction of innate immune response through TLR2 and dectin 1 prevents type 1 diabetes. *J. Immunol.* 2008, 181:8323-8334.
13. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nierras CR, Todd JA, Rich SS, Nerup J: Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes* 2010, 59:1561-157110.2337/db10-0076.
14. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS: Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 2009, 41:703-70710.1038/ng.381.
15. Plagnol V, Howson JMM, Smyth DJ, Walker N, Hafler JP, Wallace C, Stevens H, Jackson L, Simmonds MJ, Bingley PJ, Gough SC, Todd JA: Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. *PLoS Genet.* 2011, 7:e100221610.1371/journal.pgen.1002216.
16. Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, Cagnard N, Carpentier W, Tang Q, Bluestone J, Chatenoud L, Klatzmann D, Salomon BL, Piaggio E: IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 2010, 207:1871-187810.1084/jem.20100209.

17. Fornari TA, Donate PB, Macedo C, Sakamoto-Hojo ET, Donadi EA, Passos GA: Development of type 1 diabetes mellitus in nonobese diabetic mice follows changes in thymocyte and peripheral T lymphocyte transcriptional activity. *Clin. Dev. Immunol.* 2011, 2011:15873510.1155/2011/158735.
18. Rassi DM, Junta CM, Fachin AL, Sandrin-Garcia P, Mello S, Silva GL, Evangelista AF, Magalhães DA, Wastowski IJ, Crispim JO, Martelli-Palomino G, Fernandes APM, Deghaide NNHS, Foss-Freitas MC, Foss MC, Soares CP, Sakamoto-Hojo ET, Passos GAS, Donadi EA: Gene expression profiles stratified according to type 1 diabetes mellitus susceptibility regions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008, 1150:282-28910.1196/annals.1447.064.
19. Han D, Leyva CA, Matheson D, Mineo D, Messinger S, Blomberg BB, Hernandez A, Meneghini LF, Allende G, Skyler JS, Alejandro R, Pugliese A, Kenyon NS: Immune profiling by multiple gene expression analysis in patients at-risk and with type 1 diabetes. *Clin. Immunol.* 2011, 139:290-30110.1016/j.clim.2011.02.016.
20. Planas R, Pujol-Borrell R, Vives-Pi M: Global gene expression changes in type 1 diabetes: insights into autoimmune response in the target organ and in the periphery. *Immunol. Lett.* 2010, 133:55-6110.1016/j.imlet.2010.08.001.
21. Reynier F, Pachot A, Paye M, Xu Q, Turrel-Davin F, Petit F, Hot A, Auffray C, Bendelac N, Nicolino M, Mouglin B, Thivolet C: Specific gene expression signature associated with development of autoimmune type-1 diabetes using whole-blood microarray analysis. *Genes Immun.* 2010, 11:269-27810.1038/gene.2009.112.
22. Billings LK, Florez JC: The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010, 1212:59-7710.1111/j.1749-6632.2010.05838.x.
23. Prokopenko I, McCarthy MI, Lindgren CM: Type 2 diabetes: new genes, new understanding. *Trends Genet.* 2008, 24:613-62110.1016/j.tig.2008.09.004.
24. Zeggini E, McCarthy MI: TCF7L2: the biggest story in diabetes genetics since HLA? *Diabetologia* 2007, 50:1-410.1007/s00125-006-0507-x.
25. Weedon MN, Clark VJ, Qian Y, Ben-Shlomo Y, Timpson N, Ebrahim S, Lawlor DA, Pembrey ME, Ring S, Wilkin TJ, Voss LD, Jeffery AN, Metcalf B, Ferrucci L, Corsi AM, Murray A, Melzer D, Knight B, Shields B, Smith GD, Hattersley AT, Di Rienzo A, Frayling TM: A common haplotype of the glucokinase gene alters fasting glucose and birth weight: association in six studies and population-genetics analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 2006, 79:991-100110.1086/509517.
26. Bouatia-Naji N, Rocheleau G, Van Lommel L, Lemaire K, Schuit F, Cavalcanti-Proença C, Marchand M, Hartikainen A-L, Sovio U, De Graeve F, Rung J, Vaxillaire M, Tichet J, Marre M, Balkau B, Weill J, Elliott P, Jarvelin M-R, Meyre D, Polychronakos C, Dina C, Sladek R, Froguel P: A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science* 2008, 320:1085-108810.1126/science.1156849.
27. Cho YM, Kim TH, Lim S, Choi SH, Shin HD, Lee HK, Park KS, Jang HC: Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. *Diabetologia* 2009, 52:253-26110.1007/s00125-008-1196-4.
28. Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, Zeggini E, Huth C, Aulchenko YS, Thorleifsson G, McCulloch LJ, Ferreira T, Grallert H, Amin N, Wu G, Willer CJ, Raychaudhuri S, McCarroll SA, Langenberg C, Hofmann OM, Dupuis J, Qi L, Segrè AV, van Hoek M, Navarro P, Ardlie K, Balkau B, Benediktsson R, Bennett AJ, Blagieva R, et al.: Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat. Genet.* 2010, 42:579-58910.1038/ng.609.

29. Hayashi Y, Kajimoto K, Iida S, Sato Y, Mizufune S, Kaji N, Kamiya H, Baba Y, Harashima H: DNA microarray analysis of whole blood cells and insulin-sensitive tissues reveals the usefulness of blood RNA profiling as a source of markers for predicting type 2 diabetes. *Biol. Pharm. Bull.* 2010, 33:1033-1042.
30. Marselli L, Thorne J, Dahiya S, Sgroi DC, Sharma A, Bonner-Weir S, Marchetti P, Weir GC: Gene expression profiles of Beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. *PLoS ONE* 2010, 5:e1149910.1371/journal.pone.0011499.
31. Ghosh S, Dent R, Harper M-E, Gorman SA, Stuart JS, McPherson R: Gene expression profiling in whole blood identifies distinct biological pathways associated with obesity. *BMC Med Genomics* 2010, 3:5610.1186/1755-8794-3-56.
32. Hakonarson H, Grant SFA: GWAS and its impact on elucidating the etiology of diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 2011, 10.1002/dmrr.1221Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21630414>.Acessado 14 novembro 2011.
33. Macias-Gonzalez M, Cardona F, Queipo-Ortuño M, Bernal R, Martin M, Tinahones FJ: PPARgamma mRNA expression is reduced in peripheral blood mononuclear cells after fat overload in patients with metabolic syndrome. *J. Nutr.* 2008, 138:903-907.
34. Ozsari L, Karadurmus N, Sahin M, Uckaya G, Ural AU, Kutlu M: Comparison of lymphomononuclear cell energy metabolism between healthy, impaired glucose intolerance and type 2 diabetes mellitus patients. *Endocrine* 2010, 37:135-13910.1007/s12020-009-9281-0.
35. Kaizer EC, Glaser CL, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, White PC: Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007, 92:3705-371110.1210/jc.2007-0979.
36. Kaaja R, Rönnemaa T: Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to mother and offspring. *Rev Diabet Stud* 2008, 5:194-20210.1900/RDS.2008.5.194.
37. Watanabe RM, Black MH, Xiang AH, Allayee H, Lawrence JM, Buchanan TA: Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007, 30 Suppl 2:S134-14010.2337/dc07-s205.
38. Robitaille J, Grant AM: The genetics of gestational diabetes mellitus: evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus. *Genet. Med.* 2008, 10:240-25010.1097/GIM.0b013e31816b8710.
39. Ortega-Senovilla H, Schaefer-Graf U, Meitzner K, Abou-Dakn M, Graf K, Kintscher U, Herrera E: Gestational diabetes mellitus causes changes in the concentrations of adipocyte fatty acid-binding protein and other adipocytokines in cord blood. *Diabetes Care* 2011, 34:2061-206610.2337/dc11-0715.
40. Saucedo R, Zarate A, Basurto L, Hernandez M, Puella E, Galvan R, Campos S: Relationship between circulating adipokines and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes. *Arch. Med. Res.* 2011, 42:318-32310.1016/j.arcmed.2011.06.009.
41. Radaelli T, Lepercq J, Varastehpour A, Basu S, Catalano PM, Hauguel-De Mouzon S: Differential regulation of genes for fetoplacental lipid pathways in pregnancy with gestational and type 1 diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2009, 201:209.e1-209.e1010.1016/j.ajog.2009.04.019.
42. Zhao Y-H, Wang D-P, Zhang L-L, Zhang F, Wang D-M, Zhang W-Y: Genomic expression profiles of blood and placenta reveal significant immune-related pathways and categories in Chinese women with gestational diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 2011, 28:237-24610.1111/j.1464-5491.2010.03140.x.
43. Collares CVA, Evangelista AF, Xavier DJ, Navarro FN, Macedo C, Manoel-Caetano FS, Rassi

- DM, Foss-Freitas MC, Foss MC, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Donadi EA: Transcriptome metanalysis of peripheral blood mononuclear cells of type 1, type 2 and gestational diabetes mellitus patients features modulated immune system and metabolism genes. *Endocrine Reviews* (Meeting Abstracts in The Endocrine Society's 93rd Annual Meeting & Expo, 2011, Boston, MA) 2011, 32Available: http://www.zotero.org/support/pt/quick_start_guide#bibliografias_manuais. Acessado 24 novembro 2011.
44. Segal E, Friedman N, Koller D, Regev A: A module map showing conditional activity of expression modules in cancer. *Nat. Genet.* 2004, 36:1090-109810.1038/ng1434.
45. Lopez F, Textoris J, Bergon A, Didier G, Remy E, Granjeaud S, Imbert J, Nguyen C, Puthier D: TranscriptomeBrowser: a powerful and flexible toolbox to explore productively the transcriptional landscape of the Gene Expression Omnibus database. *PLoS ONE* 2008, 3:e400110.1371/journal.pone.0004001.
46. Chessel D, Dufour AB, Thioulouse J: The ade4 package - I : One-table methods. *R News* 2004, 4:5-10.
47. Hong F, Breitling R, McEntee CW, Wittner BS, Nemhauser JL, Chory J: RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* 2006, 22:2825-282710.1093/bioinformatics/btl476.
48. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998, 95:14863-14868.
49. Yu W, Yesupriya A, Wulf A, Hindorff LA, Dowling N, Khoury MJ, Gwinn M: GWAS Integrator: a bioinformatics tool to explore human genetic associations reported in published genome-wide association studies. *Eur. J. Hum. Genet.* 2011, 19:1095-109910.1038/ejhg.2011.91.
50. Yu W, Clyne M, Khoury MJ, Gwinn M: Phenopedia and Genopedia: disease-centered and gene-centered views of the evolving knowledge of human genetic associations. *Bioinformatics* 2010, 26:145-14610.1093/bioinformatics/btp618.
51. Huang DW, Sherman BT, Tan Q, Kir J, Liu D, Bryant D, Guo Y, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA: DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35:W169-17510.1093/nar/gkm415.
52. Tannahill GM, O'Neill LAJ: The emerging role of metabolic regulation in the functioning of Toll-like receptors and the NOD-like receptor Nlrp3. *FEBS Lett.* 2011, 585:1568-157210.1016/j.febslet.2011.05.008.
53. Wu C-H, Yeh C-T, Shih P-H, Yen G-C: Dietary phenolic acids attenuate multiple stages of protein glycation and high-glucose-stimulated proinflammatory IL-1beta activation by interfering with chromatin remodeling and transcription in monocytes. *Mol Nutr Food Res* 2010, 54 Suppl 2:S127-14010.1002/mnfr.200900395.
54. Miao L, St Clair DK: Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2009, 47:344-35610.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018.
55. Savic D, Ye H, Aneas I, Park S-Y, Bell GI, Nobrega MA: Alterations in TCF7L2 expression define its role as a key regulator of glucose metabolism. *Genome Res.* 2011, 21:1417-142510.1101/gr.123745.111.
56. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J: AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009, 458:1056-106010.1038/nature07813.

57. Cheng K, Ho K, Stokes R, Scott C, Lau SM, Hawthorne WJ, O'Connell PJ, Loudovaris T, Kay TW, Kulkarni RN, Okada T, Wang XL, Yim SH, Shah Y, Grey ST, Biankin AV, Kench JG, Laybutt DR, Gonzalez FJ, Kahn CR, Gunton JE: Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates beta cell function in mouse and human islets. *J. Clin. Invest.* 2010, 120:2171-218310.1172/JCI35846.
58. Fernandes APM, Louzada-Junior P, Foss MC, Donadi EA: HLA-DRB1, DQB1, and DQA1 allele profile in Brazilian patients with type 1 diabetes mellitus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002, 958:305-308.
59. Britten AC, Mijovic CH, Barnett AH, Kelly MA: Differential expression of HLA-DQ alleles in peripheral blood mononuclear cells: alleles associated with susceptibility to and protection from autoimmune type 1 diabetes. *Int. J. Immunogenet.* 2009, 36:47-5710.1111/j.1744-313X.2008.00823.x.
60. Rojas-Villarraga A, Botello-Corzo D, Anaya J-M: HLA-Class II in Latin American patients with type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* 2010, 9:666-67310.1016/j.autrev.2010.05.016.
61. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG: Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol. Rev.* 2011, 91:79-11810.1152/physrev.00003.2010.
62. Törn C, Gupta M, Sanjeevi CB, Aberg A, Frid A, Landin-Olsson M: Different HLA-DR-DQ and MHC class I chain-related gene A (MICA) genotypes in autoimmune and nonautoimmune gestational diabetes in a Swedish population. *Hum. Immunol.* 2004, 65:1443-145010.1016/j.humimm.2004.09.002.
63. Fernandes APM, Foss MC, Donadi EA: HLA-DQB1 alleles may influence the surface expression of DQ molecules in lymphomononuclear cells of type 1 diabetes mellitus patients. *Scand. J. Immunol.* 2004, 59:305-30910.1111/j.0300-9475.2004.01386.x.
64. Williams AJK, Aitken RJ, Chandler MA-M, Gillespie KM, Lampasona V, Bingley PJ: Autoantibodies to islet antigen-2 are associated with HLA-DRB1*07 and DRB1*09 haplotypes as well as DRB1*04 at onset of type 1 diabetes: the possible role of HLA-DQA in autoimmunity to IA-2. *Diabetologia* 2008, 51:1444-144810.1007/s00125-008-1047-3.
65. Papadopoulou A, Lynch KF, Shaat N, Nilsson A, Lernmark B, Berntorp K, Ivarsson S-A, Agardh C-D, Lernmark A: The type 1 diabetes protective HLA DQB1*0602 allele is less frequent in gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 2009, 52:1339-134210.1007/s00125-009-1351-6.
66. Wong FS, Hu C, Xiang Y, Wen L: To B or not to B--pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes. *Curr. Opin. Immunol.* 2010, 22:723-73110.1016/j.coi.2010.10.002.
67. Song J, Ren P, Zhang L, Wang XL, Chen L, Shen YH: Metformin reduces lipid accumulation in macrophages by inhibiting FOXO1-mediated transcription of fatty acid-binding protein 4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 393:89-9410.1016/j.bbrc.2010.01.086.

Figure1. Heatmap representative of type of diabetes, demographic, clinical, laboratory and treatment features of the patients. The presence or the value higher than mean values of the character is indicated. This information was used as array (experimental) set for the module map construction.

Figure2. Heatmap of the significative functional categories of the genes of the 19 clusters obtained by non-informative filters (DBM-MCL algorithm), in the basis of a FDR $\alpha \leq 0.1$. The categories were obtained from DAVID knowledge base with an enrichment pvalue ≤ 0.05 after Benjamini correction. The grey scale represents the logarithm of the enriched pvalue.

Figure3. Principal component analysis (PCA) evaluated before and after the study of gene clusters obtained by partitioning analysis (DBF-MCL algorithm) in the basis of a $FDR \leq 0.1$. Panel A shows the hybridization patterns, encompassing a total of 8,469 transcripts, of each patient with T1D (yellow), T2D (green) and GDM (red) patients, in which T1D and GDM patients share hybridization patterns. After evaluating the influence of gene clusters obtained by partitioning analysis, we observed that inflammatory genes were implicated on the intermingles hybridization patterns of T1D and GDM, as seen in Panel B, encompassing 8469 minus 111 genes of cluster 12.

Figure 4. Venn diagram of differentially expressed genes after paired analysis of the three types of DM. The genes were identified by Rank Product analysis with $pvalue \leq 0.001$ and a $pfp \leq 0.05$. The analysis were in A) T1D vs. GDM; B) T2D vs. GDM; C) T1D vs. T2D.

Figure5. Heatmap of the significant functional categories of the differentially expressed genes obtained by paired Rank Products analysis with $p\text{-value} \leq 0.001$ and $p\text{-fdr} \leq 0.05$ (T1D vs. GDM; T2D vs. GDM and T1D vs. T2D). The categories were obtained from DAVID knowledge base with an enrichment $p\text{-value} \leq 0.05$ after Benjamini correction. The grey scale represents the logarithm of the enriched pvalue.

Figure6. Heatmaps of the modules identified by Genomica tool which compares gene lists of immune cells and diabetic association genes with demographic, clinical, laboratory and treatment features of patients (hypergeometric statistics with $pvalue \leq 0.05$, corrected by $FDR \leq 0.05$). The four module maps presented list of genes (induced or repressed) , identified by: A) Non-informative filters (DBF-MCL algorithm) in the basis of $FDR \leq 10\%$; B) Rank products analysis of T1D vs. GDM; C) Rank products analysis of T2D vs. GDM; Rank Products analysis of T1D vs. T2D.