UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

THAIS CRISTINE ARNS

Identificação de cascatas gênicas com base na modulação transcricional de células sanguíneas mononucleares periféricas de pacientes com diabetes mellitus do tipo 1

RIBEIRÃO PRETO

2013

THAIS CRISTINE ARNS

Identificação de cascatas gênicas com base na modulação transcricional de células sanguíneas mononucleares periféricas de pacientes com diabetes mellitus do tipo 1

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior

RIBEIRÃO PRETO

2013

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

Arns, Thais Cristine

Identificação de cascatas gênicas com base na modulação transcricional de células sanguíneas mononucleares periféricas de pacientes com diabetes mellitus do tipo 1. Ribeirão Preto, 2013.

159p.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Passos, Geraldo Aleixo

1. Diabetes do tipo 1, 2. *Microarrays*, 3. *Gene Set Analysis (GSA)*, 4. Expressão gênica, 5. Bioinformática.

FOLHA DE APROVAÇÃO

THAIS CRISTINE ARNS

Identificação de cascatas gênicas com base na modulação transcricional de células sanguíneas mononucleares periféricas de pacientes com diabetes mellitus do tipo 1

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

Área de Concentração: Imunologia

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, pela força, compreensão, confiança e estímulo a mim conferidos
para a concretização de mais esta etapa.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edson Arns e Elizete Fronza, pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta jornada. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao meu irmão Augusto, meu melhor amigo, pelo incentivo, confiança e conselhos.

Aos meus avós paternos e maternos, Adalberto e Diva, Faustino (*In memoriam*) e Divanir, por todo amor e ensinamentos.

Ao meu padrasto, Carl Janer, por todo apoio e incentivo.

Aos meus amigos Adam Martins, Thiago Freitas e André da Rosa, que continuaram sempre presentes em minha vida, apesar da distância.

Ao Prof. Dr. Geraldo Passos pela orientação e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço a oportunidade e a confiança que me foi dada, possibilitando meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada, Professor!

Aos pesquisadores participantes do projeto temático FAPESP, ao qual este trabalho está inserido: Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo e Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi.

À Adriane Feijó pela amizade, ensinamentos constantes e contribuição na realização deste trabalho. Você foi parte essencial do meu aprendizado.

Às amigas do Laboratório de Imunogenética Molecular: Nathalia Bispo Cézar, Amanda F. Assis e Renata Almeida. Vocês são extremamente especiais para mim. Muito obrigada pelo apoio, discussões de *papers*, ideias, e contribuições neste trabalho, e também pelos ótimos momentos vividos durante este mestrado.

À Luciana Chaim Veronez, pela amizade e pelos momentos memoráveis durante esses anos de mestrado.

Às colegas do Laboratório de Imunogenética Molecular Claudia Macedo, Cristhiana Collares, Ernna Domingues, Janaína Dernowsek, Juliana Massaro, Milena Pereira, Nicole Pezzi, Paula Barbim e Thaís Fornari pelo apoio e convivência durante o mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Mutagênese, Danilo Jordão Xavier, Paula Takahashi e Fernanda Caetano.

À Diane Meyre Rassi, pelas sugestões e importantes contribuições a esse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, especialmente ao coordenador, Prof. Dr. João Santana da Silva. Agradeço aos professores pela contribuição em minha formação científica e aos colegas de pós-graduação, e à Secretaria do Departamento, em especial à secretária Ana Cristine Ferreira, pelo apoio dispensado durante o mestrado.

À FAPESP pelo apoio financeiro necessário para a realização deste trabalho e ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições, críticas e sugestões.

A todos aqueles que, mesmo não tendo sido mencionados, contribuíram para a realização deste trabalho durante esta jornada educacional.

Muito Obrigada.
Thais Cristine Arns.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.”

Carl Sagan

RESUMO

ARNS, T. C. ***Identificação de cascatas gênicas com base na modulação transcricional de células sanguíneas mononucleares periféricas de pacientes com diabetes mellitus do tipo 1.*** 2013. 159p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, 2013.

O diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune crônica, durante a qual as células beta pancreáticas, responsáveis pela secreção de insulina, são seletivamente destruídas. O desenvolvimento desta doença é uma consequência da predisposição genética combinada a fatores ambientais largamente desconhecidos e eventos estocásticos. Neste trabalho foi proposta a comparação da expressão gênica transcricional em grande escala (transcriptoma) entre amostras de pacientes de DM1 e controles, obtidas a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). As alterações resultantes na expressão gênica causada pela doença podem ser amostradas em PBMCs, uma vez que as células imunes efetoras estão presumivelmente em equilíbrio com a população celular circulante. A fim de identificar alterações na expressão gênica, foram utilizados métodos analíticos como a tecnologia de *microarrays* e o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson, sendo possível observar aumento ou diminuição na expressão gênica e também a magnitude desta mudança. Além disso, foi realizada análise de grupos gênicos (*gene sets* ou GSA), método baseado na significância de conjuntos gênicos pré-definidos, ao invés de genes individuais. Este procedimento é mais adequado para análise de uma doença poligênica, tal como o DM1. A análise de GSA possibilitou a seleção de genes envolvidos, por exemplo, nas seguintes vias: cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB, regulação da via de sinalização do receptor de TGF- β , regulação da cascata de JAK-STAT e via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas, das quais podem ser identificados marcadores transcricionais. A análise imparcial do transcriptoma de PBMCs permitiu a identificação de *gene sets* e genes associados ao DM1, seu perfil de expressão preferencial em tipos celulares do sistema imune e seus padrões de modulação.

PALAVRAS-CHAVE: diabetes *mellitus* do tipo 1, *microarrays*, Gene Set Analysis (GSA), expressão gênica, bioinformática.

ABSTRACT

ARNS, T. C. ***Identification of gene cascades based on the transcriptional modulation of peripheral blood mononuclear cells from type 1 diabetes mellitus patients.*** 2013. 159p. Master's Dissertation – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Type 1 diabetes *mellitus* (T1DM) is a chronic autoimmune disease, in which the pancreatic beta cells responsible for secretion of insulin are selectively destroyed. The development of this disease is a result of genetic predisposition combined with largely unknown environmental factors and stochastic events. In this work it was proposed to compare the large scale transcriptional gene expression (transcriptome) between samples obtained from T1DM patients and healthy controls, obtained from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The resulting changes in gene expression caused by the disease can be sampled in PBMCs, as immune effector cells are presumably in equilibrium with the circulating cell population. In order to identify changes in gene expression, we used analytical methods such as microarray technology and calculating the Pearson correlation coefficient, where it was possible to observe increases or decreases in gene expression and also the magnitude of change. Furthermore, we performed a gene set analysis (GSA) method based on the significance of predefined gene sets instead of individual genes. This procedure is more suitable for analyzing a polygenic disease such as T1DM. GSA analysis enabled the selection of genes involved for example, in the following pathways: I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade, regulation of TGF- β receptor signaling pathway, regulation of JAK-STAT cascade and cytokine and chemokine mediated signaling pathway, from which transcriptional markers can be identified. An unbiased transcriptome analysis of PBMCs allowed the identification of gene sets and genes associated with T1DM, its preferential expression profile in cell types of the immune system and its modulation patterns.

KEYWORDS: Type 1 diabetes, *microarrays*, Gene Set Analysis (GSA), gene expression, bioinformatics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Comunicação entre as células do sistema imune na instalação e progressão do DM1	28
Figura 2 – Loci de susceptibilidade ao DM1 mapeados até o ano 2009 em função da OR (<i>Odds Ratio</i> – Razão de Chances) para os alelos de risco em cada gene candidato.....	33
Figura 3 – Representação do desenvolvimento do DM1	36
Figura 4 – Densitometria da amostra de RNA de um paciente com DM1 isolada de PBMCs	52
Figura 5 – Figura representativa das etapas de transcrição reversa, amplificação, purificação e hibridação de <i>microarrays</i> da plataforma Agilent	54
Figura 6 – Gráfico <i>boxplot</i> de todas as amostras de <i>microarrays</i> utilizados neste trabalho, antes da normalização pelo método quantile	65
Figura 7 – Gráfico <i>boxplot</i> de todas as amostras de <i>microarrays</i> utilizados neste trabalho, após a normalização pelo método quantile.	66
Figura 8 – Agrupamento hierárquico da matriz de expressão da totalidade dos dados normalizados, comparando-se controles (barra azul) com pacientes diabéticos (barra cinza).	68
Figura 9 – Agrupamento hierárquico resultante da aplicação do coeficiente de correlação de Pearson aos dados normalizados.....	70
Figura 10 – Agrupamento hierárquico de transcritos e amostras que compõe o <i>gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB</i> , comparando-se controles (barra azul) com pacientes diabéticos (barra cinza).....	75
Figura 11 – Agrupamento hierárquico de transcritos e amostras que compõe o <i>gene set Regulação da via de sinalização do receptor de TGF-β</i> , comparando-se controles (barra azul) com pacientes diabéticos (barra cinza)	77
Figura 12 – Agrupamento hierárquico de transcritos e amostras que compõe o <i>gene set Regulação da cascata de JAK-STAT</i> , comparando-se controles (barra azul) com pacientes diabéticos (barra cinza)	79

Figura 13 – Agrupamento hierárquico de transcritos e amostras que compõe o <i>gene set Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas</i> , comparando-se controles (barra azul) com pacientes diabéticos (barra cinza)	81
Figura 14 – Gráfico ilustrativo gerado pelo banco de dados IMMGEN (http://www.immgen.org/) mostrando a representação do perfil de expressão do gene CDKN1C em diversos tipos celulares onde esse gene é expresso.....	83
Figura 15 – Reação de PCR em tempo real para avaliação dos níveis de expressão do gene <i>IL2RB</i> em controles saudáveis e pacientes afetados pelo DM1.....	87
Figura 16 – Reação de PCR em tempo real para avaliação dos níveis de expressão do gene <i>NOD2</i> em controles saudáveis e pacientes afetados pelo DM1.....	88
Figura 17 – Reação de PCR em tempo real para avaliação dos níveis de expressão do gene <i>TNF</i> em controles saudáveis e pacientes afetados pelo DM1 ...	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais características clínicas de pacientes com DM1 utilizados no estudo	50
Tabela 2 – Características demográficas dos controles utilizados no estudo	50
Tabela 3 – <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real e suas respectivas sequências (<i>sense</i> e <i>antisense</i>).....	61
Tabela 4 – Transcritos que compõe o <i>gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB</i> , sua modulação e localização cromossômica	71
Tabela 5 – Transcritos que compõe o <i>gene set Regulação da via de sinalização do receptor de TGF-β</i> , sua modulação e localização cromossômica.....	76
Tabela 6 – Transcritos que compõe o <i>gene set Regulação da cascata de JAK-STAT</i> , sua modulação e localização cromossômica	78
Tabela 7 – Transcritos que compõe o <i>gene set Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas</i> , sua modulação e localização cromossômica.....	80
Tabela 8 – Legenda dos tipos celulares disponíveis no banco de dados IMMGEN (http://www.immgen.org/) e demonstrados na Figura 13.....	84
Tabela 9 – Marcadores transcricionais preferenciais para tipo celular presentes no sistema imune, selecionados para cada <i>gene set</i> discutido no trabalho	85
Tabela 10 – Marcadores transcricionais preferencialmente expressos em tipos celulares encontrados no sistema imune e respectivos transcritos que mostraram perfil de expressão semelhante, selecionados em cada <i>gene set</i> discutido no trabalho	86
Tabela 11 – Modulação da expressão gênica obtida a partir das análises de PCR em tempo real.	90

LISTA DE SÍMBOLOS

ADA: American Diabetes Association

AIRE: Autoimmune regulator

APC: Antigen-presenting cell

Ratos BB: Biobreeding rat

BCL-2: B-cell Cll/lymphoma 2

B-IND1: Protein tyrosine phosphatase-like a domain containing 1

BST2: Bone marrow stromal cell antigen 2

CD40: TNF receptor superfamily member 5

CD95: FAS (TNF receptor superfamily, member 6)

CDC: Center for Disease Control

CDCs: Células dendríticas convencionais

CDKN1C: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1c (P57, Kip2)

cDNA: DNA complementar

cRNAs: RNA complementar

CTLA4: Cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4

DC: Dendritic cell

DEPC: Dietilpirocarbonato

DM1: Diabetes mellitus do tipo 1

DM2: Diabetes mellitus do tipo 2

DMG: Diabetes mellitus gestacional

DNA: Deoxyribonucleic acid

F2R: Coagulation factor II (thrombin) receptor

FASLG: FAS ligand (TNF superfamily, member 6)

LIF: Leukemia inhibitory factor

CNTF: Ciliary neurotrophic factor

FAS: FAS (TNF receptor superfamily member 6)

FKBP12: Peptidyl-prolyl isomerase fkbp12

FKBP1A: Fk506 binding protein 1a, 12kDA

GAD65A: Glutamic acid decarboxylase

GSA: Gene Set Analysis

GSEA: Gene Set Enrichment Analysis

GWAS: Genome Wide Association Study

Hb1Ac: Hemoglobina glicada (Hemoglobin A1c)

HCL: Hierarchical Clustering

HIP14: Huntingtin-interacting protein 14

HLA: Human Leukocyte Antigen

HMOX1: Heme oxygenase (decycling) 1

IA-2A: Insulinoma antigen 2

IAA: Insulin autoantibody

ICA: Islet cell antibodies

IFN- γ : Interferon, gamma

IFN- α : Interferon, alpha

IL10: Interleukin 10

IL12A: Interleukin 12a (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)

IL12B: Interleukin 12b (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)

IL-13: Interleukin 13

IL17F: Interleukin 17F

IL-1 β : Interleukin 1 beta

IL2: Interleukin 2

IL22: Interleukin 22

IL23: Interleukin 23

IL27: Interleukin 27

IL2RA: Interleukin 2 receptor, alpha

IL2RB: Interleukin 2 receptor, beta

IL31RA: Interleukin 31 receptor, alpha

IL4: Interleukin 4

IL6: Interleukin 6

ImmGen: Immunological Genome Project

iNKT: Invariant natural killer t cell

iNOS: Inducible nitric oxide synthase

INS: Insulina

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LTBR: Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)

MAPK: Mitogen-activated protein (MAP) kinases

MHC: Major Histocompatibility Complex

MLLV-RT: Moloney murine leukemia virus – reverse transcriptase

mRNA: RNA mensageiro

NF- κ B: Nuclear factor kappa B

NK: Natural killer cell

NO: Nitric oxide

NOD: Non-obese diabetic mice

OGTT: Oral glucose tolerance test

OMS: Organização Mundial da Saúde

OSM: Oncostatina M

OR: Odds Ratio

PAR1: Prader-Willi/Angelman region-1

PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells

PPP5C: Protein phosphatase 5, catalytic subunit

PRDX4: Peroxiredoxin 4

PTPLAD1: Protein tyrosine phosphatase-like a domain containing 1

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

Rho-GTPase: Rho family of GTPases

RNA: Ribonucleic acid

RIN: RNA Integrity Number

SIGIRR: Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain

T1DM: Type 1 diabetes mellitus

TCR: T cell receptor

TGF- β : Transforming growth factor beta

TNF: Tumor necrosis factor

TNFAIP3: Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3

TNF- α : Tumor necrosis factor, alpha

TRADD: TNFRSF1A-associated via death domain

Treg: Regulatory T cells

TRIM13: Tripartite motif containing 13

VNTRs: Variable Number Of Tandem Repeats

ZDHHC17: Zinc finger, dhhc-type containing 17

ZnT8A: Zinc transporter 8

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 O Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1	22
1.2 Mecanismos autoimunes no diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1	24
1.2.1 Características da autoimunidade humoral.....	24
1.2.2 Características da imunidade celular no diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1	25
1.3 Susceptibilidade genética ao diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1	29
1.3.1 O antígeno leucocitário humano (HLA).....	29
1.3.2 Genes não-HLA	31
1.4 Fatores ambientais.....	34
1.5 Análise do transcriptoma pela tecnologia de <i>microarrays</i>	37
1.6 Análise bioinformática dos dados de <i>microarray</i> aplicada ao <i>diabetes</i>	39
2 HIPÓTESE	42
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral	44
3.2 Objetivos específicos	44
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DA ANÁLISE <i>IN SILICO</i>.....	46
5 MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1 Seleção de controles e pacientes com diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1	49
5.2 Coleta de sangue e isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes e controles	51
5.3 Extração de RNA total e avaliação da integridade	51
5.4 <i>Oligo-microarrays</i>	52
5.5 Aquisição de imagens de hibridização	55
5.6 Quantificação dos dados de <i>microarray</i>	55
5.7 Análise dos dados de <i>microarray</i>	55
5.7.1 Normalização	56
5.7.2 Agrupamento hierárquico dos dados normalizados	56
5.7.3 Correlação de Pearson	57
5.7.4 Análise de Gene Sets (<i>Gene Set Analysis</i>)	57
5.7.5 Cálculo de <i>fold change</i>	58
5.7.6 Agrupamento hierárquico dos genes presentes nos <i>gene sets</i>	58

5.7.7 Seleção de marcadores transcricionais preferencialmente expressos em tipos celulares encontrados no sistema imune	58
5.8 Reações de transcrição reversa.....	59
5.9 Reação de PCR em tempo real para confirmação dos dados de <i>microarrays</i>	59
5.10 Análise estatística dos dados de PCR em tempo real	61
5.10.1 Cálculo de <i>fold change</i> das análises de PCR em tempo real	61
5.10.2 Cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de <i>fold change</i> dos dados provenientes dos <i>microarrays</i> e da PCR em tempo real.....	62
7 RESULTADOS.....	64
7.1 Normalização dos dados de <i>microarray</i>	64
7.2 Agrupamento hierárquico dos dados normalizados	67
7.3 Correlação de Pearson	69
7.4 Análise de Gene Sets (<i>Gene Set Analysis</i>).....	71
7.4.1 <i>Gene set: Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB</i>	71
7.4.2 <i>Gene set: Regulação da via de sinalização do receptor de TGF-β</i>	76
7.4.3 <i>Gene set: Regulação da cascata de JAK-STAT</i>	78
7.4.4 <i>Gene set: Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas</i>	80
7.5 Seleção de marcadores transcricionais preferencialmente expressos em tipos celulares encontrados no sistema imune	82
7.6 Confirmação dos dados de expressão obtidos por <i>microarrays</i> por PCR em tempo real	87
7.6.1 Modulação da expressão gênica obtida a partir das análises de PCR em tempo real.....	89
7.6.2 Coeficiente de correlação de Pearson resultante da comparação entre os valores de <i>fold change</i> dos dados provenientes dos <i>microarrays</i> e PCR em tempo real.....	90
8 DISCUSSÃO	92
8.1 <i>Gene set: Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB</i>	94
8.2 <i>Gene set: Regulação da via de sinalização do receptor de TGF-β</i>	108
8.3 <i>Gene set: Regulação da cascata de JAK-STAT</i>	111
8.4 <i>Gene set: Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas</i>	114
8.5 Confirmação dos dados de <i>microarrays</i> por PCR em tempo real	118
9 CONCLUSÕES	120
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
11 ANEXOS	150

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* consiste em um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina, ou ambos (ADA - DIABETES CARE, 2012).

Esse grupo de doenças representa a sétima principal causa de morte nos Estados Unidos, sendo também a principal causa de falha renal, de amputações não traumáticas de membros inferiores e dos novos casos de cegueira entre os adultos nesse país (CDC - National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011).

De acordo com os critérios da Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association – ADA*) publicados nas “Diretrizes de cuidados médicos - 2012” (*Standards of Medical Care - 2012*), o diagnóstico da doença é baseado em uma das seguintes alterações:

- i) níveis de hemoglobina A1C (Hb1Ac) $\geq 6,5\%$;
- ii) glicose de jejum (pelo menos 8 horas) ≥ 126 mg/dL (7 mmol/L);
- iii) glicose plasmática ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) duas horas após a carga de glicose em teste oral de tolerância à glicose (*oral glucose tolerance test - OGTT*);
- iv) paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica, com resultado de glicose plasmática ao acaso ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) (ADA - DIABETES CARE, 2012).

Das alterações citadas para diagnóstico do diabetes, o ensaio de hemoglobina A1C (Hb1Ac) é crítico no tratamento do paciente, uma vez que está correlacionado às complicações microvasculares e, em menor grau, macrovasculares, refletindo níveis médios de glicose no sangue durante um período de 2 a 3 meses (ADA - INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE, 2009).

O diabetes *mellitus* possui diferentes formas de apresentação, sendo classificado segundo a ADA (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION*, 2012), de acordo com as diferenças etiológicas em: diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1), diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2); diabetes *mellitus* gestacional (DMG); e ainda, tipos específicos, incluindo defeitos genéticos na ação da insulina; defeitos genéticos na função das células beta; endocrinopatias; doenças associadas a funções exócrinas

do pâncreas; formas induzidas por compostos químicos ou drogas; diabetes induzido por infecção; formas incomuns de diabetes mediadas pelo sistema imune e outras síndromes associadas ao diabetes (ADA - DIABETES CARE, 2012).

1.1 O Diabetes *mellitus* do tipo 1

O foco deste trabalho é o diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1), uma doença autoimune crônica, que se desenvolve como consequência da combinação de predisposição genética, fatores ambientais desconhecidos e eventos estocásticos (LEHUEN et al. 2010; TODD, 2010).

Nesta doença as células beta pancreáticas secretoras de insulina são seletivamente destruídas, enquanto as células alfa e delta pancreáticas permanecem ilesas.

As células beta pancreáticas funcionam como sensores, liberando insulina numa proporção adequada para a manutenção dos níveis fisiológicos de glicose (BLUESTONE et al., 2010). Como no DM1 existe a destruição das células beta pancreáticas e a produção endógena de insulina é anulada, os pacientes passam a ter uma vida dependente da reposição exógena da mesma.

Durante a fase pré-clínica em grande parte silenciosa da doença, a destruição das células beta pode persistir durante semanas, meses, ou mesmo anos, até que a produção de insulina seja insuficiente para manter o metabolismo normal da glicose, levando ao desenvolvimento de hiperglicemia e possíveis complicações associadas a diversos órgãos devido à falta de insulina (BLUESTONE et al., 2010; LEHUEN et al., 2010; GAN et al., 2012).

Alguns pacientes, principalmente crianças e adolescentes, podem apresentar cetoacidose como a primeira manifestação da doença. A cetoacidose diabética pode ser caracterizada por hiperglicemia, acidose metabólica, desidratação e cetose. Os critérios de diagnóstico de cetoacidose diabética incluem níveis de glicose no sangue superiores a 250 mg/dL (13,9 mmol/L), pH $\leq 7,3$, nível de bicarbonato no soro < 18 mEq/L (18 mmol/L) e cetonas totais > 3 mmol/L. Outros pacientes possuem hiperglicemia modesta em jejum que pode mudar rapidamente para hiperglicemia severa e/ou cetoacidose na presença de infecção ou outro estresse. Outros ainda,

principalmente adultos, podem reter a função de células beta residual suficiente para prevenir cetoacidose por muitos anos; tais indivíduos eventualmente tornam-se dependentes de insulina para sobreviver e estão em risco de cetoacidose. Nesta última fase da doença, há pouca ou nenhuma secreção de insulina, que se manifesta por níveis baixos ou indetectáveis de peptídeo C plasmático. Este segmento de 31 aminoácidos que liga as cadeias A e B da pró-insulina e serve para promover a dobra eficiente, montagem e processamento da molécula de insulina no retículo endoplasmático das células beta durante a biossíntese da insulina (PATEL et al., 2010; LUPPI et al., 2011; ADA - DIABETES CARE, 2012).

A transição da fase pré-clínica para o aparecimento clínico do DM1 é característica, com grandes aumentos na concentração de glicose relativamente agudos, acompanhados por sintomas como polidipsia, polifagia e poliúria (ADA - DIABETES CARE, 2009).

Uma vez que o diagnóstico de DM1 tenha sido estabelecido e o uso de insulina tenha sido iniciado, o foco do tratamento é voltado para prevenção de complicações decorrentes da doença, pois problemas relacionados ao DM1 caracterizam um sério problema de saúde pública mundial. O DM1 induz complicações a curto e longo prazo. As primeiras são emergências metabólicas, agudas e que representam risco de vida, incluindo cetoacidose diabética e eventos de hipoglicemia grave. Complicações em longo prazo são caracterizadas por doenças crônicas microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doença cardíaca isquêmica e acidente vascular cerebral), que podem levar à incapacidade, reduzir qualidade e expectativa de vida e envolvem enormes custos para o sistema de saúde (FRANCIOSI et al., 2012).

Dados referentes à incidência do DM1 estão disponíveis através de projetos como o DIAMOND da OMS, que busca avaliar a incidência do DM1 no mundo, estimada em 5-10% de todos os casos de diabetes (KARVONEN et al., 2000; DIAMOND PROJECT GROUP, 2006; ADA - DIABETES CARE, 2012). 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; GAN et al., 2012).

Nos Estados Unidos, entre os jovens com idade <10 anos, a taxa de novos casos de DM1 é de 19,7 por 100 mil a cada ano. Entre os jovens de 10 anos ou

mais, a taxa de novos casos foi de 18,6 por 100 mil a cada ano. Jovens brancos não hispânicos tiveram a maior taxa de novos casos de DM1 (24,8 por 100 mil por ano entre os menores de 10 anos e 22,6 por 100 mil por ano entre os 10 a 19 anos) (CDC - National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011).

No Brasil, dados epidemiológicos disponíveis para o DM1 estimam a existência de 7,6 indivíduos afetados em 100 mil habitantes (FERREIRA et al., 1993; LISBÔA et al., 1998).

1.2 Mecanismos autoimunes no diabetes *mellitus* do tipo 1

Vários eventos imunes “silenciosos” ocorrem no período anterior aos sintomas clínicos de DM1 se tornarem aparentes. Durante esse período, anticorpos são produzidos e linfócitos autoreativos são ativados e infiltram o pâncreas para destruir as células beta produtoras de insulina das ilhotas de Langerhans, caracterizando a insulite e tornando o indivíduo dependente de insulina para sobreviver (VAN BELLE et al, 2011; POLYCHRONAKOS et al., 2011).

O DM1 clínico representa o estágio final da insulite, e estima-se que, no momento do diagnóstico apenas 10 a 20% das células beta ainda estejam em funcionamento (KNIP et al., 2008).

1.2.1 Características da autoimunidade humoral

A característica humoral do DM1 é representada pelos autoanticorpos associados a essa doença, que incluem, por exemplo:

- i) autoanticorpos contra ilhotas pancreáticas (ICA),
- ii) autoanticorpos contra a descarboxilase do ácido glutâmico 65 (GAD65A),
- iii) autoanticorpos contra proteína 2 associada a insulinoma (IA-2A),
- v) autoanticorpos contra insulina (IAA),

vi) e recentemente foram descritos autoanticorpos contra o transportador de zinco 8 (ZnT8A) (KNIP et al., 2008).

O número de autoanticorpos presentes no soro de um paciente tem sido muito utilizado para distinguir o DM1 das outras formas de apresentação do diabetes, além de proporcionar informação útil quanto ao risco de DM1, sendo que a presença de múltiplos autoanticorpos é muito mais preditiva de doença do que qualquer anticorpo ou qualquer combinação específica de anticorpos (KNIP, 2002; WENZLAU, 2007; ORBAN et al., 2009; BLUESTONE et al., 2010; PATEL et al., 2010).

Normalmente um ou mais destes autoanticorpos estão presentes em 85-90% dos indivíduos quando a hiperglicemia de jejum é inicialmente detectada (ADA - DIABETES CARE, 2012).

Em estudos familiares a positividade para três ou quatro autoanticorpos está associada a um risco de desenvolvimento de DM1 clínico na faixa de 60 a 100% ao longo dos próximos 5 a 10 anos (BINGLEY et al., 1994).

De forma geral, a presença de autoanticorpos implica um papel para linfócitos B produtores de anticorpos no princípio da patogênese do DM1 humano, mas acredita-se que talvez a maior contribuição das células B para a doença seja o papel que desempenham como células apresentadoras de antígeno, que mantêm a atividade de células T específicas para os antígenos de ilhotas (HU et al., 2007; PESCOVITZ et al., 2009).

1.2.2 Características da imunidade celular no diabetes *mellitus* do tipo 1

O sistema imunológico possui um delicado equilíbrio entre a tolerância ao próprio e a resposta imune dirigida aos patógenos. No indivíduo saudável estes dois estados se encontram em uma escala de resposta, onde uma mudança na direção de um dos extremos da escala, ou seja, a falta de uma resposta (imunodeficiência) ou uma resposta inadequada excessiva (autoimunidade e alergia) resulta em condições fisiopatológicas e muitas vezes na manifestação de doenças (KYEWSKI et al., 2004; KYEWSKI et al., 2006).

Um importante componente do equilíbrio da resposta imune é o mecanismo de tolerância central. Esse mecanismo refere-se aos eventos no início da vida de um

linfócito que ocorrem nos locais primários do desenvolvimento dos mesmos - a medula óssea para o desenvolvimento de células B e o timo para o desenvolvimento de células T - e abrange todos os mecanismos pelos quais o receptor de reconhecimento de antígenos reconhece autoantígenos e resulta em autotolerância. Para células T em desenvolvimento, muitos dos receptores de antígenos (TCR) aleatoriamente rearranjados são inúteis, pois estes receptores não são capazes de ligar os alelos de MHC que estão presentes no indivíduo. A função de tais moléculas MHC é se ligar a peptídeos antigênicos e os apresentar para serem reconhecidos pelos linfócitos T específicos. Os peptídeos associados a moléculas MHC de classe I são reconhecidos por células T $CD8^+$, enquanto os peptídeos antigênicos associados às moléculas MHC de classe II são reconhecidos pelas células T $CD4^+$. Assim, um passo crucial para os progenitores de células T é a seleção positiva, onde apenas as células que expressam um receptor de células T (TCR) que podem interagir com complexos peptídeo-próprio-MHC continuam o processo de diferenciação. Este passo, é claro, possibilita a sobrevivência de células autoreativas, tornando o perigo da autoimunidade inerente ao sistema imune adaptativo.

Felizmente, existe a seleção negativa, onde os progenitores mais fortemente autoreativos sofrem deleção clonal e são os progenitores fracamente reativos que amadurecem, povoam os órgãos linfoides e participam nas respostas imunes a antígenos estranhos (ROITT, 2001; KYEWSKI et al., 2004; HOGQUIST et al., 2005; ABBAS, 2010; JANEWAY, 2010).

Embora os mecanismos de tolerância central sejam eficientes, não podem eliminar todos os linfócitos autoreativos, em parte, porque nem todos os autoantígenos são expressos no local primário de desenvolvimento linfocitário. Para isso existem mecanismos de tolerância periférica, e estes induzem os linfócitos que primeiro encontrarem seus antígenos próprios fora do principal local de desenvolvimento a se tornarem tolerantes (KYEWSKI et al., 2004; HOGQUIST et al., 2005; DERBINSKI et al., 2010; ANDERSON et al., 2011; METZGER, 2011).

Além de possíveis falhas no mecanismo de tolerância central, diversos processos celulares e moleculares têm sido propostos como responsáveis pelo desenvolvimento do DM1, entre eles a ativação de células T autoimunes através de mimetismo molecular.

O mimetismo molecular seria causado por reações cruzadas geradas por semelhança de sequências entre epítomos virais e autoantígeno, que poderiam teoricamente conduzir à ativação de células T autoreativas e destruição de tecidos após uma infecção viral (OU et al., 2000; HONEYMAN et al., 2010; LEHUEN et al., 2010).

Outro mecanismo proposto para o desenvolvimento do DM1 seria a ativação de células T autoreativas através de danos às células vizinhas às células beta no pâncreas. O mecanismo ocorreria de tal modo que uma infecção viral pudesse levar à ativação não específica de células do sistema imune, por meio da criação de um ambiente pró-inflamatório e a ativação de células T através da exposição a antígenos liberados de ilhotas. Assim, a infecção viral pode ter um papel no desenvolvimento do DM1 através da potenciação da doença autoimune em curso pela indução de citocinas inflamatórias e a estimulação da apresentação de autoantígenos por APCs (KATZ et al., 1993; HORWITZ et al., 1998; LEHUEN et al., 2010).

Após a ocorrência da falha dos mecanismos normais de autotolerância o ataque às células beta pancreáticas poderia ocorrer de diversas formas. Uma dessas formas seria, por exemplo, células T $CD8^+$ atacando células beta através de citotoxicidade mediada por MHC de classe I. Além disso, ambas as células T $CD4^+$ e $CD8^+$ produzem citocinas, tais como $IFN-\gamma$, que induzem a expressão do receptor de morte FAS (também conhecido como CD95) e produção de quimiocinas pelas células beta. Ativação de FAS por células T ativadas que expressam o ligante de FAS (FASLG) poderiam iniciar a apoptose de células beta. Produção de quimiocinas pelas células beta resulta em recrutamento adicional de células mononucleares para o local de injúria, aumentando a inflamação (MAEDLER et al., 2001; ROEP, 2003; CANTOR et al., 2007; SKOWERA et al., 2008; EIZIRIK et al., 2009; LEHUEN et al., 2010).

Como demonstrado na Figura 1, existe intensa comunicação entre as células do sistema imune na instalação e progressão do DM1.

Figura 1. Comunicação entre as células do sistema imune na instalação e progressão do DM1. A fase de iniciação do DM1 ocorre no pâncreas, onde células dendríticas convencionais (CDCs) capturam e processam os antígenos provenientes das células beta. A IL-12 liberada por macrófagos ativa as CDCs, que por sua vez apresentam os antígenos para células T CD4^+ específicas após a migração para o linfonodo de drenagem. Estes linfócitos sofrem proliferação por expansão clonal e se dirigem para as células beta pancreáticas nas ilhotas. As células efetoras recrutam os linfócitos T CD8^+ citotóxicos e outras células inflamatórias, o que resulta em insulite destrutiva. As células beta podem ser mortas por células T diabetogênicas (células T patogênicas específicas para antígenos de ilhotas) e células NK, através da libertação de $\text{IFN-}\gamma$, granzimas e perforina, bem como por macrófagos através da produção de TNF , $\text{IL-1}\beta$ e óxido nítrico. As APCs e os linfócitos T produzem citocinas pró-inflamatórias, levando a um maior recrutamento e ativação de células T (Adaptado de LEHUEN et al., 2010).

1.3 Susceptibilidade genética ao diabetes *mellitus* do tipo 1

Apesar de ser fortemente influenciada por fatores genéticos, DM1 não se encaixa em nenhum padrão mendeliano de herança e é considerada uma doença complexa e multifatorial (HALLER et al., 2005; BAKER et al., 2011).

Os indivíduos com um parente de primeiro grau afetado têm um risco de 1 em 20 (5%) de desenvolver DM1, em comparação com um risco de 1 em 300 (0,3%) que existe para a população em geral (REDONDO et al., 2001; GILLESPIE et al., 2002).

Estudos relacionados ao componente genético do DM1 começaram na década de 1970 com estudos de ligação (*linkage studies*) que revelaram a contribuição fundamental do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) para a suscetibilidade a esta doença. Outros estudos de ligação, incluindo o realizado pelo *Genetics T1D Consortium (T1DGC)*, demonstraram a ausência de outros *loci* comparáveis em magnitude de efeito ao MHC. No entanto, estudos de associação de genes candidatos revelaram *loci* adicionais não-MHC que estão associados com DM1, e a partir de 2007 estudos de associação do tipo GWAS (*Genome-wide association studies*) aumentaram o número de *loci* associados ao DM1 para mais de 50 (BARRET et al., 2009; CONCANNON et al., 2009; TYPE 1 DATABASE (disponível em <http://www.t1dbase.org>)).

1.3.1 O antígeno leucocitário humano (HLA)

As moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano são chamadas de antígeno leucocitário humano (HLA), localizados no cromossomo 6p21.3. Esta região de 4 Mb contém mais de 200 genes, dos quais 40% são relacionados ao sistema imune (ANONYMOUS, 1999; HORTON et al., 2004).

Tais moléculas são classificadas em três grupos: classe I, classe II e classe III. A região gênica que codifica tais moléculas é ampla e estes genes são altamente polimórficos, podendo existir mais de 250 alelos para alguns desses genes na população.

As moléculas de classe I são expressas em todas as células nucleadas, enquanto as moléculas de classe II são expressas principalmente nas células apresentadoras de antígenos especializadas, como as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B, além de alguns outros tipos celulares, incluindo as células endoteliais e as células epiteliais do timo.

Além dos genes polimórficos, existem nessa região genes que codificam proteínas do complemento, citocinas, moléculas não polimórficas semelhantes à classe I e várias proteínas envolvidas no processamento de antígenos (ROITT, 2001; ABBAS, 2010; JANEWAY, 2010).

A maior parte da susceptibilidade ao DM1 reside no *loci* HLA de classe II DR e DQ. Os haplótipos comuns que conferem maior risco de DM1 são DRB1*04-DQB1*0302 e DRB1*03, encontrados em mais de 90% dos casos de DM1. Por outro lado, uma forte proteção é conferida pelo alelo DQB1*0602, presente em aproximadamente 15% dos europeus, mas em menos de 1% dos casos de DM1 (PUGLIESE et al., 1995; MELANITOU, et al., 2003; ERLICH et al., 2008).

A complexidade dos efeitos funcionais de tais alelos é ressaltada pelo fato de que a heterozigosidade para os dois principais haplótipos de predisposição (DR3/DR4) confere um risco consideravelmente maior do que homozigosidade para ambos (DR3/DR3 ou DR4/DR4) (ALY et al., 2006; ERLICH et al., 2008).

Esta diversidade de sequências funcionais é impulsionada por uma forte pressão seletiva que favorece heterozigosidade e uma vasta gama de seletividade antigênica para aperfeiçoar a resposta imune contra uma grande variedade de agentes patogênicos atuais e emergentes.

Esta seleção recente e ambientalmente modulada é responsável por amplas diferenças populacionais em alelos de HLA, o que pode explicar em parte as diferenças geográficas na incidência de DM1. A incidência do DM1 é de somente 0,1 em 100 mil habitantes na China, Índia e Venezuela, sendo muito mais comum na ilha da Sardenha (Itália) e na Finlândia, onde as incidências são próximas de 50 casos por 100 mil habitantes/ano. Taxas de incidência de mais de 20 casos por 100 mil habitantes são observadas na Suécia, Noruega, Portugal, Reino Unido, Canadá e Nova Zelândia (BLUESTONE et al., 2010; VAN BELLE, 2011; POLYCHRONAKOS et al., 2011).

O mecanismo molecular de tão poderosa modulação de risco da doença tem sido estudado há décadas, impulsionado por seu grande potencial como alvo terapêutico, mas nossa compreensão permanece incompleta.

Além dos alelos de classe II, os alelos HLA de classe I também contribuem para o risco DM1, porém de forma muito mais fraca. Acredita-se que as moléculas de HLA de classe I, e as células T CD8⁺ para as quais apresentam antígenos, tornam-se muito importantes nas fases posteriores da destruição das células beta (CORPER et al., 2000; SKOWERA et al., 2008; YOSHIDA et al., 2010; POLYCHONAKOS et al., 2011).

Além da associação com DM1, a região gênica que compreende o HLA está fortemente associada com outras doenças autoimunes, tais como doença de Crohn e lúpus eritematoso sistêmico (VAN LIMBERGEN et al., 2009; DENG et al., 2010).

1.3.2 Genes não-HLA

A partir de 1980, além dos genes localizados na região do HLA, começaram a ser descobertas regiões não-HLA que apresentavam genes relacionados ao DM1 através de estudos de genes candidatos. Esses genes apresentavam efeito modesto em relação à associação de genes HLA e o DM1; e foram inicialmente identificados 4 *loci* de risco não-HLA: *INS*, *CTLA4*, *PTPN22* e *IL2RA* (BELL et al., 1984; NISTICO et al., 1996; BOTTINI et al., 2004; LOWE et al., 2007; BAKER et al., 2011).

A insulina foi estabelecida como autoantígeno primário no DM1 e foi envolvida no risco de DM1 com o maior efeito de magnitude depois dos genes HLA. O gene da insulina se encontra localizado no cromossomo 11p15.5 e o mapeamento genético detalhado mostrou que a susceptibilidade reside em polimorfismos de VNTRs (número variável de repetições *em tandem*) na região promotora deste gene (BELL et al., 1984; LUCASSEN et al., 1993; BENNETT et al., 1995).

A magnitude do risco relacionado ao desenvolvimento do DM1 está relacionada ao número das repetições *em tandem*, pois a hipótese predominante seria de que estas repetições regulam os níveis de expressão de insulina no timo, afetando a ligação do fator de transcrição *AIRE* com sua região promotora. Este fator de transcrição desempenha a regulação de uma miríade de genes para garantir

a representação adequada de autoantígenos no timo. Indivíduos homozigotos para VNTR do tipo 1 (que possuem repetições mais curtas) se encontram na categoria de maior risco, pois vão induzir baixos níveis de transcrição de insulina e seus precursores no timo, levando a uma tolerância reduzida e desenvolvimento de DM1. Da mesma forma, células T autoreativas para insulina são eliminadas de forma mais eficiente pela seleção negativa no timo de indivíduos que possuem a variante alélica protetora de VNTR do tipo III (que possuem repetições mais longas) (PUGLIESE et al., 1997; VAFIADIS et al., 1997; HANAHAN et al., 1998; ANDERSON et al., 2002; CHENTOUFI et al., 2002; MACEDO et al., 2009).

Depois da insulina, o *PTPN22* é o que confere maior risco relativo à doença, apresentando uma OR (*Odds ratio*) muito próxima à apresentada pelo gene da insulina (POCIOT et al., 2010). A OR é uma medida de risco relativo, que avalia se as chances de um determinado evento ou resultado ocorrer é o mesmo para dois grupos, nesse caso seriam o grupo controle e grupo de pacientes (HISCHHORN; DALY, 2005; WANG et al., 2005).

PTPN22 está localizado no cromossomo 1p13 e codifica a tirosina fosfatase linfóide (LYP), que participa da regulação negativa de sinais derivados do receptor de célula T (TCR), atuando como supressor da ativação de linfócitos T (BOTTINI et al., 2004; STECK et al., 2009). A mesma variante alélica está envolvida ao risco em diversas outras doenças autoimunes (BOTTINI et al., 2004; CRISWELL et al., 2005; BOTTINI et al., 2006).

Como citado anteriormente, os *loci* *CTLA4* no cromossomo 2q33 e *IL2RA* no 10p15 também foram associados em vários estudos ao DM1.

IL2RA é um importante marcador de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (Treg), conhecidas por serem cruciais na manutenção da homeostase imune e inibição de doenças autoimunes, já tendo sido implicado em outras doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla (VELLA et al., 2005; LOWE et al., 2007; SAKAGUCHI et al., 2011).

CTLA4 codifica um co-receptor transmembrana específico de células T que transduz o seu efeito inibidor através de fosfatases citoplasmáticas e como *PTPN22* (LYP), também é um importante regulador negativo da ativação das células T (POLYCHRONAKOS et al., 2011).

Polimorfismos relacionados ao *CTLA4* foram associados ao DM1 e outras doenças autoimunes, tais como doença de Graves e doença de Addison (NISTICO et al., 1996; KRISTIANSEN et al., 2000; ANJOS et al., 2004).

Com o surgimento de estudos do tipo GWAS, tornou-se possível a identificação de inúmeros outros *loci* (HAKONARSON et al., 2007; HAKONARSON et al., 2008; BARRET et al., 2009), previamente desconhecidos, sendo atualmente aceito que mais de 50 *loci* genéticos não-HLA contribuem para o DM1 (POCIOT et al., 2010; TYPE 1 DATABASE, disponível em: <http://www.t1dbase.org>).

A Figura 2 demonstra a OR dos genes HLA e alguns genes não-HLA mapeados como loci de susceptibilidade ao DM1 até o ano de 2009.

Figura 2 – Loci de susceptibilidade ao DM1 mapeados até o ano 2009 em função da OR (*Odds Ratio* – Razão de Chances) para os alelos de risco em cada gene candidato. As cores representam o ano de descoberta dos genes candidatos. A maior parte destes genes está relacionado ao sistema imune. * Genes não-HLA expressos nas ilhotas pancreáticas humanas. (Adaptado de POCIOT et al., 2010).

1.4 Fatores ambientais

Estudos epidemiológicos sugerem que fatores ambientais influenciam o desenvolvimento do DM1 em humanos (HYOTY et al., 1993; VON HERRATH et al., 2003).

Ao lado de fatores de predisposição genéticos e mecanismos específicos desencadeantes, tais como mimetismo molecular e envolvimento de infecções virais, os aumentos na incidência têm sido tão rápidos que qualquer explicação que omite a mudança ambiental é incompleta (ROOK, 2012).

Além disso, parece haver poucas dúvidas de que o DM1 é uma doença da “civilização”, com inúmeras alterações ao nosso ambiente desde os anos 1940 e 1950, incluindo saneamento, saúde e dieta podendo influenciar na patogênese da doença (KARVONEN et al., 1993; PATTERSON et al., 2001; BACH et al., 2002; AKIRA et al., 2006; WEN et al., 2008; ZIPITIS et al., 2008; COOKE et al., 2009; FARQUHAR et al., 2010).

A hipótese da higiene, também conhecida como “hipótese dos velhos amigos” (*Old Friends Hypothesis*), pode ser rastreada até a década de 1870, quando Charles Harrison Blackley notou que aristocratas e moradores de centros urbanos eram mais propensos a ter rinite do que os agricultores (BLACKLEY, 1873). Similarmente, em 1966, *Leibowitz et al.*, observaram que a incidência de esclerose múltipla em Israel foi positivamente correlacionada com os níveis de saneamento (LEIBOWITZ et al., 1966).

A expressão “hipótese dos velhos amigos” foi cunhada para fornecer uma síntese “darwiniana”, e chamar a atenção para o fato de que a higiene doméstica moderna não é a questão importante. As doenças crônicas inflamatórias que começaram a aumentar na Europa em meados do século XIX (alergias, doenças inflamatórias intestinais, autoimunidade [DM1, esclerose múltipla]), todas mostram evidências de defeitos relacionados com a regulação do sistema imune (KRIEGEL et al., 2004; VIGLIETTA et al., 2004; BADAMI et al., 2011).

A hipótese de velhos amigos sugere que uma razão para a incidência cada vez maior de distúrbios inflamatórios crônicos em países desenvolvidos desde meados do século XIX é o esgotamento no ambiente urbano de organismos que acompanharam a evolução dos mamíferos, incluindo o homem, e vêm sendo tolerados ao longo do tempo (BACH et al., 2002; ROOK et al., 2010).

Alguns destes organismos são tolerados e são essenciais à simbiose da microbiota intestinal. A co-evolução Homem-helminthos favoreceu a tolerância e a atenuação da resposta imune contra o patógeno. A co-evolução com patógenos acabou por favorecer vias imunomoduladoras envolvidas na tolerância imunológica periférica (ROOK et al., 2010).

Mas nem todas as evidências apontam para um papel benéfico das infecções. Alguns agentes patogênicos, em particular os vírus, podem acelerar o aparecimento do DM1 através da indução de respostas inflamatórias após a infecção direta de células beta, bem como através de outros mecanismos (LEHUEN et al., 2010).

Com relação aos hábitos alimentares, alguns estudos sugerem a introdução precoce de leite de vaca como um fator predisponente ao DM1, ao contrário do aleitamento materno prolongado durante a infância (MAYER et al., 1988; DAHLQUIST et al., 1992; KOSTRABA et al., 1993).

O leite de vaca, em particular o seu componente de albumina, foi relacionado com a promoção da autoimunidade contra ilhotas pancreáticas, porque foi encontrada reatividade cruzada entre os anticorpos do soro para albumina e ICA-1 (p69), uma proteína da superfície da célula beta (KARJALAINEN et al., 1992).

A ideia emergente da ingestão do leite de vaca como um parâmetro de contribuição ao desenvolvimento do DM1 foi logo contestada por relatórios que não foram capazes de demonstrar qualquer relevância causal (ATKINSON et al., 1993; NORRIS et al., 1996). Este tópico referente à introdução do leite de vaca na alimentação é objeto de controvérsia, já que mesmo em estudos utilizando modelos animais de camundongos NOD e ratos BB os resultados relatados foram contraditórios (DANEMAN et al., 1987; MALKANI et al., 1997).

Finalmente, não existe a intenção de sugerir uma única razão que possa levar ao desencadeamento do DM1 e outras doenças autoimunes, mas sim uma combinação ampla de mimetismo molecular, susceptibilidade genética, hábitos alimentares, infecções virais, entre outros; que juntamente com a mudança ambiental simultânea podem levar ao enfraquecimento da regulação do sistema imune, de modo que certos genótipos, na presença de certos “gatilhos”, pudessem desenvolver a autoimunidade.

A Figura 3 tem o intuito de sumarizar tudo o que foi discutido até agora referente à imunidade humoral e celular, predisposição genética e fatores ambientais no desencadeamento e progressão do DM1.

Figura 3. Representação do desenvolvimento do DM1. Esta figura representa a massa ou função de células beta (representada pela linha laranja), bem como as diferentes fases imunológicas (colunas com abas em ordem alfabética no topo) que ocorrem nos locais relevantes anatômicos (linhas com separadores numéricos à direita). Eventos específicos serão designados através de coordenadas alfanuméricas na seguinte explicação. Uma vez que a linha cor de laranja de função das células beta cai na zona vermelha, o indivíduo é clinicamente diagnosticado com DM1. Uma complicada série de eventos precede este acontecimento e permanece largamente despercebida. Inicialmente, uma coincidência infeliz de susceptibilidade genética (a1) e um “gatilho” ambiental (a2) leva um indivíduo a desenvolver diabetes, através de dois eventos. No pâncreas, células beta aumentam a expressão de IFN-α (b3) e, subsequentemente, de MHC de classe I (c3). Isto expõe as células beta ao ataque por células T CD8⁺ autoreativas com especificidade para antígenos do pâncreas (c3). Em seguida, os antígenos liberados pelas células beta são captados por células apresentadoras de antígenos residentes (APC) (c3) e transferidos para o linfonodo drenante (LN) do pâncreas (c2). Enquanto isso, na periferia (c1), o “gatilho” ambiental causou o *switch* metabólico, criando um ambiente pró-inflamatório que favorece respostas de células T efetoras em detrimento das células T reguladoras (Treg). Antígenos de células beta apresentados neste contexto pró-inflamatório e com a ajuda de células T CD4⁺ (c2) iniciam a conversão das células B em células plasmáticas produtoras de anticorpos (d2) e ao aparecimento de autoanticorpos para insulina (soroconversão) (d1). Além disso, as células T CD8⁺ autoreativas são estimuladas a proliferar (d2) e a migrar para dentro do pâncreas (d3). O stress induzido por esta segunda onda de morte das células beta (d3), que envolve perforina, IFN-γ e de TNF-α, faz com que algumas células beta parem a produção de insulina (pseudoatrofia). Esse ataque também provoca a liberação de novos antígenos de células beta, que são captados por APCs, incluindo células B que migraram (d3), e são transportados para o LN pancreático (d3-d2). Isto envolve células T CD4⁺ e CD8⁺ com novas especificidades antigênicas (e2) e células B (e1) em um processo chamado disseminação de epítomos. Uma onda subsequente de morte de células beta ocorre e é, portanto, mais grave e geralmente resulta numa maior depleção de massa e função de células beta (e3). Surpreendentemente, a inflamação autoimune pode também estimular alguma proliferação das células beta (f3), de modo que a massa de células beta temporariamente “ressuscita”. Além disso, células Tregs às vezes podem dominar e diminuir a resposta efetora (f3). A flutuação entre respostas autoreativas destrutivas e o alívio causado pela regulação imune e proliferação das células beta possivelmente cria um perfil de recaída e remissão de massa de células beta (linha laranja). Eventualmente, a resposta autoreativa prevalece, e o DM1 é diagnosticado quando apenas 10 a 30% das células beta funcionais permanecem. A remissão após o diagnóstico clínico de DM1 é chamada de “fase de lua de mel” (f3), um estado temporário de relativa produção de insulina autossuficiente (Adaptado de VAN BELLE et al., 2011).

1.5 Análise do transcriptoma pela tecnologia de *microarrays*

Pelo exposto, o DM1 é uma doença multifatorial por excelência, mas com forte contribuição genética. Entretanto, a contribuição funcional dos diversos genes envolvidos na sua patogenia ainda não está totalmente resolvida.

Precisamos determinar os níveis de expressão dos diversos genes implicados no DM1 e/ou apontarmos outros que seriam diferencialmente expressos, mas ainda não “descobertos” pelos estudos de associação genética.

Nossa estratégia para isso é o uso da tecnologia dos *microarrays* para explorar o transcriptoma, ou seja, a expressão transcricional dos genes.

As aplicações mais poderosas do perfil transcricional envolvem o estudo de padrões de expressão gênica em uma grande variedade de respostas celulares, fenótipos e condições (SCHENA et al., 1995; BROWN et al., 1999; QUACKENBUSH, 2001).

Além disso, nos dias de hoje os *microarrays* permitem a avaliação dos níveis de expressão gênica de milhares de genes de uma só vez, e é esta mudança quantitativa da escala de medição gênica que levou a uma alteração qualitativa na nossa capacidade para compreender os processos regulatórios que ocorrem a nível celular (KOHANE, 2003). Pelo conhecimento do perfil de expressão gênica, é possível responder importantes questões, tais como, quais vias biológicas e quantos genes estão envolvidos num determinado processo biológico, e quais suas intensidades de expressão (KURELLA et al., 2001; QUACKENBUSH, 2001; BREITLING et al., 2006).

Além disso, o transcriptoma é variável entre os diferentes tipos de células, tecidos e órgãos de um dado indivíduo, sendo que as próprias condições fisiológicas normais, como as diferentes fases do ciclo celular, ou patológicas, como por exemplo, infecções ou neoplasias, influenciam no perfil do transcriptoma (PASSOS et al., 2000).

O ponto de partida para um experimento de *microarray* é a hibridização por complementaridade de bases de um conjunto de RNAs de fita simples (sondas) depositados em uma lâmina, aos fragmentos de DNA ou RNA provenientes das amostras. Um *microarray* típico consiste de fragmentos de tais sondas complementares para os transcritos imobilizadas num substrato sólido, como por

exemplo, lâminas de vidro. Os *microarrays* utilizados no presente trabalho foram produzidos pela Agilent Technologies (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e são construídos pela síntese direta de sondas de oligonucleotídeos em lâminas de vidro previamente preparadas por um sistema de impressão, processo conhecido como *SurePrint*. Este processo de síntese *in situ* possibilita a deposição de oligonucleotídeos, base a base, com extrema precisão utilizando arquivos de mRNA provenientes de bancos de dados.

Os transcritos (RNAs) são então extraídos de amostras (sangue, tecidos, células, entre outros) a serem investigadas, são marcados com corantes fluorescentes (tecnologia *monocolor* ou *two-color*), hibridizados nas lâminas de vidro, lavados, e escaneados com um laser de comprimento de onda específico para o corante fluorescente utilizado. Sondas que correspondem a RNAs transcritos hibridizam com o seu alvo complementar. Devido à marcação com corantes fluorescentes a intensidade da luz pode ser utilizada como uma medida da expressão gênica (REIMERS, 2010; SELVARAJ et al., 2011).

Com o crescente aprendizado sobre o design, química e cinética dos *microarrays* a qualidade dos dados melhorou drasticamente. Reconhecimento de vieses e outros artefatos por laboratórios individuais e organizações, como o projeto de Controle de Qualidade de *Microarrays* (MAQC), levou ao desenvolvimento de padrões de controle de qualidade que atuam para garantir a utilidade de um experimento de *microarray* bem realizado (SHI et al., 2006).

A utilização de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) para realização da análise do transcriptoma tem como objetivo identificar os reflexos do DM1 no perfil transcricional dos pacientes afetados em comparação com controles saudáveis. De fato, células do sangue periférico expressam uma grande proporção de genes codificados no genoma humano, o que torna possível o estudo do efeito de mudanças clínicas relevantes na expressão gênica (assinaturas de expressão gênica). Além disso, o sangue periférico é um tecido ideal, pois é de fácil obtenção e oferece um grande *pool* na forma de transcritos gênicos responsivos às mudanças no corpo de origem ambiental ou genética (LIEW et al, 2006; REYNIER et al, 2010).

Além disso, pesquisas conduzidas em PBMCs e em sangue total, empregando a tecnologia de *microarrays*, têm demonstrado padrões distintos de expressão gênica entre indivíduos saudáveis e diabéticos, com a identificação de vias biológicas relacionadas ao metabolismo celular, associadas ao diabetes

autoimune (RASSI et al., 2006; KAIZER et al., 2007; RASSI et al., 2008; WANG et al., 2008; JUNTA et al., 2009; REYNIER et al., 2010; LEVY et al., 2012; MANOEL-CAETANO & XAVIER et al., 2012).

1.6 Análise bioinformática dos dados de *microarray* aplicada ao *diabetes*

Desde o início, a análise de *microarrays* facilitou a descoberta da atividade gênica, associando expressão transcricional às características da amostra biológica e/ou clínica.

No entanto, o processo de análise dos dados provenientes de um experimento de *microarray* é complexo, envolve várias etapas de processamento dos dados, depende de diversos programas, bancos de dados e lida com grandes quantidades de dados heterogêneos; todos os quais necessitam de apoio adequado de ferramentas de *softwares* (QUACKENBUSH et al., 2001; AITOKALLIO et al., 2003; BILD et al., 2005; SUBRAMANIAN et al., 2005; KOSCHMIEDER et al., 2011).

Para superar estes desafios analíticos, foi utilizado neste trabalho um método desenvolvido por *Efron & Tibshirani* em 2006, chamado Análise de Gene Set (*Gene Set Analysis - GSA*), que analisa os dados de *microarrays* tomando conjuntos de genes (*gene sets*). Os *gene sets* são definidos com base no conhecimento biológico prévio, como por exemplo, informações sobre vias bioquímicas já publicadas e validadas (SUBRAMANIAN et al., 2005; EFRON & TIBSHIRANI, 2006).

O primeiro trabalho publicado utilizando uma versão preliminar do GSA, o GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis - GSEA*), utilizou para análise os dados de biópsias musculares de diabéticos *versus* controles saudáveis, na busca por vias biológicas que apresentavam significância estatística, demonstrando que métodos desse tipo se encaixam muito bem no estudo de doenças multifatoriais, tal como o diabetes (MOOTHA et al., 2003).

A metodologia do GSA apresenta uma série de vantagens em comparação com métodos de análise tradicional, que consideram somente um gene de cada vez em seus cálculos estatísticos. A análise de um único gene pode perder importantes efeitos sobre vias, pois os processos celulares frequentemente afetam grupos de genes agindo em conjunto. Por exemplo, um aumento de apenas 20% na expressão

em todos os genes que codificam membros de uma via metabólica pode alterar dramaticamente o fluxo através da via e pode ser mais importante do que um aumento de 20 vezes na expressão de um único gene.

Em primeiro lugar, este método facilita a interpretação de experimentos em larga escala por meio da identificação de vias e processos biológicos. Além disso, ao invés de focar genes com modulação exacerbada (que podem possuir ainda poucas informações na literatura e cujos dados podem não ser reproduzidos), os pesquisadores podem concentrar-se em conjuntos de genes, cujos dados que tendem a ser mais reprodutíveis e mais interpretáveis.

A análise estatística do método GSA baseia-se no método de GSEA, mas utiliza uma estatística de “máximos e mínimos” (*maxmean*), M , em vez de a estatística de Kolmogorov-Smirnov utilizada no método GSEA para a denotação de enriquecimento gênico, potencialmente conduzindo a um maior poder estatístico. Para avaliação da significância estatística o método GSA realiza a permutação de genes, além da permutação das condições de classe do experimento.

Aproveitando a vantagem estatística proveniente das associações gênicas já estabelecidas, uma expressão gênica diferencial relativamente pequena pode combinar para criar uma forte correlação entre um conjunto de genes e uma condição experimental (EFRON & TIBSHIRANI, 2006; MANOLI et al., 2006; NAM et al., 2008; WU & LIN, 2009; WU et al., 2009). Em outras palavras, um gene com “fraca” expressão poderá ter um papel importante se analisado em conjunto com outros genes.

Utilizando o método GSA em nossos dados obtidos pela tecnologia de *microarrays*, nosso grupo buscou analisar e comparar a expressão do transcriptoma de PBMCs de pacientes afetados pelo DM1 e controles saudáveis, buscando identificar vias biológicas e genes importantes na patogênese dessa doença.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

O estudo do perfil de expressão gênica de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes portadores de diabetes *mellitus* do tipo 1 e controles saudáveis é capaz de refletir vias e processos biológicos associados ao diabetes autoimune.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão gênica de pacientes portadores do diabetes *mellitus* do tipo 1 e também de controles saudáveis, utilizando a tecnologia dos *microarrays* e análises de bioinformática.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar de forma comparativa o perfil de expressão gênica em grande escala (transcriptoma) de PBMCs de pacientes portadores do diabetes *mellitus* do tipo 1 e também de controles saudáveis por meio de agrupamento hierárquico de todos os dados normalizados.
- Avaliar de forma global a similaridade dos perfis de expressão gênica entre pacientes portadores do diabetes *mellitus* do tipo 1 e controles saudáveis utilizando o ambiente estatístico R para cálculo de coeficiente de correlação de Pearson e construção de agrupamento hierárquico dos coeficientes de correlação.
- Identificar *gene sets* estatisticamente significantes relacionados com a patogênese do diabetes *mellitus* do tipo 1 em pacientes afetados *versus* controles saudáveis a partir de análise não-supervisionada de GSA utilizando o ambiente estatístico R.
- Selecionar genes que demonstram perfil de expressão gênica preferencial em um tipo celular do sistema imune nos *gene sets* resultantes da análise de GSA e também transcritos que possuem perfil de expressão semelhante.

***DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DA
ANÁLISE IN SILICO***

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E DA ANÁLISE *IN SILICO*

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Seleção de controles e pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 1

O presente trabalho é parte integrante do projeto temático FAPESP nº 08/56594-8, sob coordenação do Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos Junior. Para realização do estudo foram selecionados pacientes com idade entre 18 e 37 anos, de ambos os sexos na Divisão de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), com a colaboração do Prof. Dr. Milton César Foss e da Prof Dr^a Maria Cristina Foss Freitas.

Os dados demográficos e clínicos dos 19 pacientes com DM1 selecionados para este estudo são apresentados na Tabela 1. De acordo com os valores de referência do Hospital Universitário de Ribeirão Preto (HCRP), os valores normais de glicose no sangue são da ordem de 70 a 100 mg / dL. Outro parâmetro utilizado para controlar a diabetes é a dosagem de hemoglobina glicosilada (HbA1c), que possui valores de referência comumente aceitos entre 4,1 a 6,3%.

Como controles foram estudados oito indivíduos saudáveis na faixa etária de 47 a 65 anos, de ambos os sexos, sem histórico familiar de DM-1 e/ou DM-2, apresentando níveis normais de glicemia no momento da coleta de sangue (Tabela 2). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCFMRP-USP (Processo: no. 9153/2008).

Tabela 1. Principais características clínicas de pacientes com DM1 utilizado no estudo.

Paciente	Idade (anos)	Sexo ¹	Tempo de doença (anos)	Glicemia (mg/dL)	HbA1c (%) ²
DM1-1	36	M	11	213	10,8
DM1-2	23	M	13	197	8,3
DM1-3	24	M	6	260	10
DM1-4	18	M	8	23	7,2
DM1-5	23	M	20	178	10,1
DM1-6	21	F	8	223	7,8
DM1-7	29	M	2	59	11,1
DM1-8	30	M	14	47	8,9
DM1-9	21	M	16	66	9
DM1-10	28	F	5	193	12,5
DM1-11	29	M	3	225	9,8
DM1-12	27	F	10	257	10,4
DM1-13	37	F	7	82	8,4
DM1-14	24	F	14	293	8,5
DM1-15	22	F	13	143	8,3
DM1-16	18	M	5	60	9,5
DM1-17	25	F	6	85	10,5
DM1-18	23	M	11	123	10,3
DM1-19	25	M	8	162	7,7

¹ M – masculino; F – feminino. ² HbA1c (%) – porcentagem de hemoglobina glicosilada.

Tabela 2. Características demográficas dos controles utilizados no estudo.

Controle	Idade (anos)	Sexo ¹	Glicemia (mg/dL)	HbA1c (%) ²
Co1	51	F	NA	NA
Co4	65	M	NA	NA
Co5	52	F	100	5.4
Co6	58	M	98	5.5
Co11	47	F	89	5.6
Co12	53	M	88	5.7
Co15	55	M	95	5.3
Co16	48	F	84	5.4

¹ M – masculino; F – feminino. ² HbA1c (%) – porcentagem de hemoglobina glicosilada.

5.2 Coleta de sangue e isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes e controles

De cada controle e paciente foram coletados 20-30 ml de sangue venoso periférico em tubos Vacutainer contendo EDTA (1,8 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA), sendo as amostras mantidas sob refrigeração até serem utilizadas na separação de PBMCs. O processamento do sangue foi realizado logo após a coleta e o protocolo adotado foi o descrito por *Böyum* (1968), sendo a fração mononuclear isolada por centrifugação em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque (d=1,077) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Para a separação celular os procedimentos incluíram a adição de mesmo volume de salina 0,9% estéril a cada amostra de sangue, sendo a solução resultante depositada sobre o colchão de Ficoll-Paque na proporção de 2:1. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 1042 x g em temperatura ambiente, obtendo-se ao final um anel de células mononucleares localizado na interface do Ficoll-Paque e plasma sanguíneo. O anel de células foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur, submetidas a duas lavagens com salina 0,9% estéril e o *pellet* obtido foi ressuspenso em salina 0,9%, previamente tratado com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich). As células foram então submetidas à extração de RNA total.

5.3 Extração de RNA total e avaliação da integridade

Para o preparo das amostras de RNA total de PBMCs humanas foi utilizado o reagente Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), que consiste de uma solução de fenol e isotiocianato de guanidina. Em todas as amostras (pacientes e controles), foi utilizado 1 ml do reagente para cada 5 ml de sangue. O RNA obtido das amostras foi suspenso em água deionizada tratada com DEPC (Sigma-Aldrich) e armazenado em freezer a -80°C. Em todas as etapas foram seguidas as recomendações dos fabricantes dos produtos e *kits*.

Foi utilizado um espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA) para quantificação e avaliação da pureza das extrações por

meio de absorbâncias e cálculo das razões. Amostras consideradas sem contaminação proteica possuem razão 260/280 entre 1.8-2.2 e ausência de contaminação por fenol na razão 260/220 entre 1.8-2.0. Foram utilizadas apenas preparações livres de fenol e de proteínas.

A integridade das amostras foi avaliada por meio de eletroforese microfluídica, utilizando-se o chip *RNA 6000 Nano* do aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Este equipamento calcula o índice (*RNA Integrity Number – RIN*) com escala de 0 a 10, baseado na qualidade da preparação de RNA. Só foram incluídas no estudo amostras com índice RIN superior ou igual a 9,0 (Figura 4). Os valores RIN de todas as amostras dos pacientes encontram-se em Anexo (ANEXO C). Em todas as etapas foram seguidas as recomendações do fabricante.

Figura 4. Densitometria da amostra de RNA de um paciente com DM1 isolada de PBMCs. A figura mostra as frações de rRNA 28S, 18S e 4-5S. *RNA integrity number* (RIN) = 9,5.

5.4 Oligo-microarrays

Para avaliação do transcriptoma dos PBMCs de pacientes com DM1 e controles saudáveis foram utilizadas lâminas de *microarrays* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), contendo cada uma, quatro regiões com 41.000 *oligos* (60 mer) representando transcritos e 3.000 controles internos preparados pelo processo

SurePrint (sistema de impressão), formato denominado de *4x44 K oligo-arrays*. Neste trabalho foi utilizada a metodologia monocolor Cy3 (cianina 3). Os procedimentos realizados para amplificação, marcação e hibridação dos mRNAs das amostras com os *microarrays* seguiram as recomendações do fabricante, sendo utilizado o *Kit Agilent Quick Amp Labeling* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Para o grupo controle foi realizada uma coleção de amostras totais de RNA (*pool*) provenientes dos 8 controles, e 3 replicatas técnicas foram realizadas. Os pacientes de DM1 foram marcados individualmente.

Foram misturadas amostras de RNA controle (*spike-in*) a 500 ng de RNA total para realização da etapa de transcrição reversa utilizando a enzima *Moloney Murine Leukemia Virus – Reverse Transcriptase (MMLV-RT)*. Além disso, foram utilizados *primers* adaptados com timinas consecutivas acopladas a um promotor T7 para síntese de cDNAs dupla fita. Após essa reação, a enzima *T7 RNA Polimerase* foi adicionada com nucleotídeos marcados com o fluorocromo Cy3 para síntese de cRNAs (RNA complementar) e posterior amplificação.

As amostras de cRNAs foram purificadas e hibridadas em lâminas de *microarrays*, utilizando-se câmaras de hibridação *Agilent Microarray Hybridization Chambers* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) que foram incubadas em forno rotativo (Agilent Technologies) a 65°C por 17 horas. Após o período de hibridação, foram realizadas lavagens das lâminas com os tampões *GE Wash Buffer 1* e *GE Wash Buffer 2*.

As lâminas de *microarray* utilizadas para RNA humano foram do tipo *Whole Human Gene Expression Microarray Kit (4x44 K)* com AMADID 014850. Os dados utilizados nesse trabalho estão disponíveis no banco de dados público *Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME)* (“MIAME - Workgroups - FGED”), pelo código de acesso: E-MEXP-3348.

Figura 5. Figura representativa das etapas de transcrição reversa, amplificação, purificação e hibridação de *microarrays* da plataforma Agilent. Adaptado de ("G4140-90040_GeneExpression_One-color_v6.5).

5.5 Aquisição de imagens de hibridização

Após as etapas de lavagens das lâminas com os tampões *GE Wash Buffer 1* e *GE Wash Buffer 2*, (Agilent Technologies), as imagens de hibridização foram obtidas com a leitura do espectro verde em 550nm, utilizando-se o scanner para *microarrays* com tecnologia de alta resolução *Surescan*, por meio do *software Feature Extraction* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

5.6 Quantificação dos dados de *microarray*

A quantificação dos dados foi realizada utilizando o *software Feature Extraction*, versão 10.7 (Agilent Technologies). O *software* realiza o posicionamento automático de *grids* por reconhecimento de regiões marginais, além de fornecer diversos parâmetros para o controle de qualidade das hibridações.

A partir da tabela de dados quantificados, foi selecionada a mediana dos dados brutos (*gMedianSignal*) e a mediana do background (*gBGMedianSignal*) para análises posteriores

5.7 Análise dos dados de *microarray*

A análise dos dados foi realizada utilizando a linguagem de programação R. A linguagem R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) consiste de ambiente estatístico-matemático que permite a execução de cálculos e visualização gráfica dos dados. Existem inúmeros pacotes para realização de múltiplas funções, amplamente utilizados em análises de dados de *microarrays*.

5.7.1 Normalização

Os dados de expressão foram introduzidos no ambiente estatístico-matemático R, versão 2.15.0. Foi então realizada a retirada dos controles positivos e negativos, eliminação de genes cujos valores sobrepuseram os valores de *background*, correção do *background* (sinal – background), e conversão dos dados em escala logarítmica ($\log_2$).

A fim de tornar os dados comparáveis e de reduzir artefatos experimentais é necessário normalizar os valores de intensidade para uma mesma escala. Existem diversos tipos de normalização para dados de *microarrays*, sendo que o principal desafio na escolha do método de normalização está em balancear os níveis de intensidade ao longo dos experimentos, mantendo os efeitos biológicos investigados. A normalização foi realizada pela metodologia *quantile*, método considerado o mais robusto, que corrige as diferenças nas densidades de probabilidade de todas as amostras (BOLSTAD et al., 2003).

Para a verificação dos dados após a normalização foi criado gráfico em formato *boxplot*.

5.7.2 Agrupamento hierárquico dos dados normalizados

Os dados resultantes da normalização foram submetidos ao agrupamento hierárquico (*Hierarchical Clustering - HCL*), que consiste de um método aglomerativo, onde os perfis de expressão semelhantes são agrupados. Genes e amostras foram submetidos ao agrupamento hierárquico. A distância métrica utilizada foi *Pearson uncentered* e o método de agrupamento foi *average linkage*.

Esses procedimentos foram realizados utilizando-se os programas *Cluster 3.0* e *TreeView 1.60* em plataforma UNIX (EISEN et al., 1998, disponível em <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>).

5.7.3 Correlação de Pearson

O cálculo da correlação de Pearson e a montagem do agrupamento hierárquico dos coeficientes de correlação de Pearson foram executados no ambiente R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). As matrizes de expressão das 3 amostras de controles (*pool* de 8 indivíduos saudáveis) e 19 pacientes foram inseridas no ambiente R e cada uma das matrizes foi relacionada a uma categoria, resultando em 22 categorias. Cada matriz de expressão continha todos os valores de expressão normalizados para cada amostra, e os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados para as 22 x 22 permutações das submatrizes; para cada par de submatriz, um coeficiente de correlação foi obtido e estes valores resultantes dos cálculos foram colocados em uma matriz de 22 x 22. Além disso, realizou-se o agrupamento hierárquico das amostras, a fim de agrupar amostras com perfil de expressão global semelhante. As análises foram realizadas utilizando o pacote *gplots* e a função *heatmap.2*.

5.7.4 Análise de Gene Sets (*Gene Set Analysis*)

A análise de Gene Sets (*Gene Set Analysis* – GSA) é um método computacional que avalia se um grupo de genes determinados *a priori* mostra diferenças estatisticamente significantes entre duas condições, por exemplo, controle e pacientes. Para realização desta análise foi utilizado o pacote GSA (EFRON & TIBSHIRANI, 2012. Disponível em <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/GSA>).

Os parâmetros para cálculo referentes ao algoritmo foram ajustados de forma que o número mínimo de genes que um *gene set* deveria conter para ser aceito era de 05 genes. Foram utilizadas 1000 permutações para execução deste cálculo.

Os *gene sets* utilizados para comparação foram retirados do banco de dados do Instituto BROAD (BROAD INSTITUTE, disponível em: <http://www.broadinstitute.org/gsea/>) e a busca por *gene sets* foi baseada nos *gene sets* contidos no arquivo *C5 Gene Ontology Sets*, um banco de dados de assinaturas moleculares (*Molecular Signatures Database* – *MsigDB*), que contém uma coleção de *gene sets* e suas respectivas anotações baseadas em termos de GO, para uso dos software GSEA e GSA. O *cut-off* para o valor de *p* (*p-value*) selecionado foi de 0.05.

5.7.5 Cálculo de *fold change*

Os dados de expressão contidos em cada *gene set* foram analisados por *fold change*, cuja função é identificar diferenças na expressão de um determinado gene entre duas condições, levando em conta um dado *cut-off* ou *threshold*. Nós estabelecemos um *fold change* de 1.0 para nossos dados, possibilitando observar qualquer diferença nos valores de expressão entre o grupo controle e o grupo dos indivíduos diabéticos.

5.7.6 Agrupamento hierárquico dos genes presentes nos *gene sets*

Os genes presentes em cada *gene set* foram submetidos ao agrupamento hierárquico (*Hierarchical Clustering - HCL*), que consiste de um método aglomerativo, onde os perfis de expressão semelhantes são agrupados. Genes e amostras foram submetidos ao agrupamento hierárquico. A distância métrica utilizada foi *Pearson uncentered* e o método de agrupamento foi *average linkage*. Esses procedimentos foram realizados utilizando-se os programas *Cluster 3.0* e *TreeView 1.60* em plataforma UNIX. (EISEN et al., 1998. Disponível em: <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>).

5.7.7 Seleção de marcadores transcricionais preferencialmente expressos em tipos celulares encontrados no sistema imune

Os genes presentes em cada *gene set* foram triados utilizando a ferramenta *Gene Skyline*, fornecida pelo banco de dados *Immunological Genome Project Database* para seleção de marcadores transcricionais preferencialmente expressos em tipos celulares encontrados no sistema imune.

O *ImmGen* é um projeto que integra 15 centros de pesquisa para obtenção de todos os tipos celulares de linhagens linfoides e mieloides em diferentes estágios de

diferenciação, maturação, ativação, estágios efetores, localização tecidual e variações genéticas (HENG; PAINTER, 2008; BENOIST et al., 2012). Disponível em <http://www.immgen.org>).

Genes que demonstraram perfil de expressão preferencial em um tipo celular foram selecionados como marcadores transcricionais preferenciais para determinado tipo celular, sendo que alguns genes foram selecionados para mais de um tipo celular. O banco de dados selecionado dentro da ferramenta *Gene Skyline* foi o *Human Hematopoietic (D-Map)* (HYATT et al., 2006; HENG et al., 2008).

5.8 Reações de transcrição reversa

Reações de transcrição reversa foram realizadas com 2 µg de RNA total proveniente de amostras de pacientes portadores de DM1 e controles saudáveis, 1 µl de oligo (dT) e 1 µl de DNTP mix 10 nM em um volume de 12 µl, segundo instruções do fabricante. As amostras permaneceram a 65°C durante 5 minutos e então foram colocadas imediatamente no gelo e foi dado um *spin*, para que se evitasse a evaporação da amostra através da abertura do tubo.

Em seguida, acrescentou-se 4 µl de *Buffer 5X First Strand*, 2 µl de dTT e 1 µl de *RNasin* e deixou-se por 2 minutos a 42°C. Adicionou-se 1 µl da enzima *Superscript II RNase H Reverse Transcriptase* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), resultando em um volume final de 20 µl. A reação permaneceu a 42°C por 50 minutos, seguidos de 15 minutos a 70°C.

5.9 Reação de PCR em tempo real para confirmação dos dados de *microarrays*

Apesar das variações em termos das metodologias de normalização de cada técnica, a validação por experimentos de PCR em tempo real encontra-se de acordo com o perfil de expressão gênica através dos *microarrays*.

As reações de PCR em tempo real foram utilizadas para confirmação dos dados de *microarrays* para três genes presentes em *gene sets* discutidos no

trabalho: *IL2RB* (presente no *gene set Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas*), *TNF* (presente no *gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB*) e *NOD2* (presente no *gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB*). O gene *HPRT* foi usado como controle endógeno.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o reagente *SYBR Green* (Applied Biosystems) em placas de 48 poços, com ciclagem padrão de aproximadamente 2 horas. O aparelho utilizado foi o *StepOne* (Applied Biosystems), juntamente com o software de leitura de mesmo nome (versão 2.1 - Applied Biosystems).

O processo consiste de 2 etapas:

- 1) Avaliação da especificidade dos produtos de PCR por meio da análise de uma curva de dissociação. Para isso, foi realizada uma quantificação absoluta de cada par de *primers*, inclusive dos genes constitutivos, utilizando diluições seriadas (1:10 a 1:1000) de cDNA para calcular a eficiência da reação e, conseqüentemente, dos *primers*. A reação consiste de amplificação seguida de dissociação.
- 2) Reação quantitativa propriamente dita. Para tal, foi realizada a quantificação relativa para avaliar a expressão gênica em cada amostra e compará-las entre si. A reação final consiste de 20 µl: 7,4 µl de água livre de nucleases, 0,8 µl de cada *primer*, 10 µl da solução de *SYBR Green* e 1 µl de cDNA sintetizado a partir de uma quantidade padronizada de RNA total (2 µg de RNA).

O protocolo de ciclagem térmica foi: 1 x 95°C durante 10 minutos (*holding stage*); 40 x: desnaturação a 95°C, 15 segundos e anelamento 60°C, 1 minuto (*cycling stage*); obtenção da curva de *melting* (*melting curve stage*). A curva é obtida após três passos, sendo o primeiro a 95°C, durante 15 segundos; o segundo a 60°C, durante 1 minuto e o terceiro a 95°C, durante 15 segundos.

Os primers utilizados foram desenhados com auxílio do *software* Primer3 (disponível em http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), cujos parâmetros foram ajustados para que todos apresentassem temperatura de anelamento (*annealing*) a 63°C (Tabela 3).

Tabela 3. Primers utilizados nas reações de PCR em tempo real e suas respectivas sequencias (*sense* e *antisense*).

Gene	Número de acesso	Sequencias <i>sense</i> e <i>antisense</i>
IL2RB	NM_000878.3	5' CTCGAGAGCCAACATCTCCT 3'
		5' AGCAGCTCACAGGTTTGGTT 3'
NOD2	NM_022162.1	5' GCATCTGCAAGCTCATTGAA 3'
		5' CCAAGAAGTTCTGCCTGCAT 3'
TNF	NM_000594.3	5' CAGCCTCTTCTCCTTCCTGA 3'
		5' GCCAGAGGGCTGATTAGAGA 3'
HPRT1	NM_000194.2	5' GACCAGTCAACAGGGGACAT 3'
		5' CTGCATTGTTTTGCCAGTGT 3'

5.10 Análise estatística dos dados de PCR em tempo real

É importante notar que a avaliação da expressão dos transcritos por PCR em tempo real ocorre por meio de análise diferente daquela empregada nos dados de microarrays. Os valores de quantificação relativa são calculados utilizando-se a comparação de genes constitutivos, conforme descrito por PFAFFL (2001).

Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o teste estatístico *teste t*, por meio do ambiente estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). Os gráficos foram construídos com auxílio do *software* GraphPad Prism 5 (disponível em <http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>).

5.10.1 Cálculo de *fold change* das análises de PCR em tempo real

O cálculo de *fold change* entre pacientes afetados pelo DM1 e controles saudáveis das análises de PCR em tempo real foi obtido através do cálculo da razão entre os valores de expressão relativa de pacientes afetados pelo DM1 e controles saudáveis.

5.10.2 Cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de *fold change* dos dados provenientes dos *microarrays* e da PCR em tempo real

O cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de *fold change* dos dados provenientes dos *microarrays* e da PCR em tempo real foram executados no ambiente estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011)

RESULTADOS

7 RESULTADOS

7.1 Normalização dos dados de *microarray*

Após a obtenção dos dados numéricos de *microarray* utilizando o *software Feature Extraction* foram realizadas etapas que compreenderam a retirada dos controles positivos e negativos existentes nas lâminas, eliminação de genes cujos valores confundiam com os valores de *background*, correção do *background* (sinal – background) e conversão dos dados numéricos em escala logarítmica ($\log_2$).

A normalização tenta corrigir variações técnicas sistemáticas entre as condições experimentais, as quais não estão relacionadas às diferenças biológicas reais. Os métodos de normalização têm como objetivo compensar essas variações sistemáticas entre lâminas e entre dados da própria lâmina, com o intuito de aprimorar a análise de diferenças biológicas entre as amostras (JORDAN, 2012).

Além disso, a fim de tornar os dados comparáveis e de reduzir artefatos experimentais foi realizada a normalização pelo método *quantile*, considerado o mais robusto para nosso tipo de dado, que corrige as diferenças nas densidades de probabilidade de todas as amostras (BOLSTAD *et al.*, 2003).

Na Figura 6 podemos observar o gráfico em formato *boxplot* demonstrando os dados de *microarrays* antes da normalização, onde cada um dos *boxes* representa uma amostra (pacientes e controles).

Na Figura 7 podemos observar o gráfico em formato *boxplot* demonstrando os dados de *microarrays* após a normalização, onde cada um dos *boxes* representa uma amostra (pacientes e controles). É possível observar que todos os *boxes* possuem mesmo comprimento e estão dispostos de maneira uniforme, caracterizando um *boxplot* representativo de amostras normalizadas.

Após a realização dos procedimentos de normalização, foram selecionados dados referentes a 20.664 mRNAs.

Figura 6. Gráfico *boxplot* de todas as amostras de *microarrays* utilizados neste trabalho, antes da normalização pelo método quantile.

Figura 7. Gráfico *boxplot* de todas as amostras de *microarrays* utilizados neste trabalho, após a normalização pelo método quantile.

7.2 Agrupamento hierárquico dos dados normalizados

Realizou-se o agrupamento hierárquico dos dados normalizados, que caracterizam 20.664 mRNAs (Figura 8).

A técnica do agrupamento hierárquico (HCL, do inglês *Hierarchical Clustering*) tornou-se uma das técnicas mais amplamente utilizadas para a análise de dados de expressão gênica, pois é uma abordagem aglomerativa, na qual os perfis de expressão individuais são unidos para formar grupos semelhantes, que são unidos novamente até que o processo tenha sido concluído, com a formação de uma única árvore hierárquica.

O processo de agrupamento hierárquico funciona da seguinte forma:

1. a matriz de distância dos pares é calculada para todos os genes a serem agrupados.
2. procura-se na matriz de distância pelos dois genes mais semelhantes ou *clusters*; inicialmente cada *cluster* é constituído por um único gene. Se vários pares possuem a mesma distância de separação, uma regra pré-determinada é utilizada para decidir entre alternativas.
3. os dois *clusters* formados são fundidos para produzir um novo grupo, que agora contém pelo menos dois objetos.
4. as distâncias são calculadas entre este novo cluster e todos os outros clusters.
5. os passos 2-4 são repetidos até que todos os objetos estejam em um cluster (QUACKENBUSH, 2001).

Pode-se observar uma clara separação entre as amostras de controles (barra cinza) e as demais amostras de pacientes (barra azul).

Figura 8 – Agrupamento hierárquico da matriz de expressão da totalidade dos dados normalizados, comparando-se controles (barra azul) com pacientes diabéticos (barra cinza). O valor de expressão normalizada de cada gene é representado pelas cores: vermelho, verde e preto. Vermelho indica níveis de expressão maiores que a mediana ou induzidos; verde indica níveis de expressão menores que a mediana ou reprimidos ($-1,0$ a $1,0$ em $\log_2$); preto indica níveis de expressão iguais à mediana ou não modulados. Os símbolos dos genes assim como o dendrograma dos mesmos não foram incluídos nesta figura.

7.3 Correlação de Pearson

Com o intuito de avaliar a similaridade dos perfis de expressão gênica transcricional entre pacientes e controles, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre as amostras.

O coeficiente de correlação de Pearson serve para avaliar a semelhança dos padrões de expressão gênica, sendo simbolizado por um r minúsculo ou a letra grega rho (ρ).

O coeficiente de correlação de Pearson indica a relação entre dois conjuntos numéricos ordenados (neste caso, os dados de expressão gênica para duas condições diferentes – controles e pacientes). Este coeficiente indica tanto como os dois conjuntos numéricos estão relacionados, como a força da referida relação. Por exemplo, se o gene A aumenta ao longo do tempo e o gene B diminui proporcionalmente, o seu valor de correlação será -1.0 porque são perfeitamente divergentes. Se os dois conjuntos não são perfeitamente divergentes, mas ainda divergiram, a correlação permanece negativa, mas será maior do que -1.0. Em contraste, se os genes A e B aumentam proporcionalmente ao longo do tempo, a sua correlação será de +1.0. Se os genes A e B não têm absolutamente nenhuma relação um com o outro, sua correlação será de 0. O coeficiente de correlação de Pearson não é sensível unicamente à direção da mudança (aumento ou diminuição), mas também à magnitude da mudança (o gene A teve um aumento de duas vezes, enquanto o gene B aumentou apenas uma vez). O valor do coeficiente de correlação está sempre no intervalo entre -1.0 e +1.0 (GASCH et al., 2000; MÅNSSON et al., 2004).

Para realização deste cálculo foram utilizados os valores de expressão normalizados de todos os 20.664 mRNAs, em cada uma das amostras.

Além disso, realizou-se o agrupamento hierárquico das amostras no gráfico de coeficiente de correlação de Pearson, de modo a agrupar os perfis de expressão com maior semelhança.

Os valores resultantes do cálculo de coeficiente de Pearson foram utilizados para confecção do agrupamento hierárquico representado na Figura 9.

Pode-se observar uma clara separação entre as amostras de controles (*CONTROL1*, *CONTROL2* e *CONTROL3*) e as demais amostras de pacientes.

Também é possível observar que a amostra *T1D13* possui a menor correlação observada na Figura 9 com a amostra *T1D17*.

Existem também diversos grupos de amostras de pacientes agrupados e que possuem uma maior correlação entre si do que com outros pacientes, como por exemplo, pacientes *T1D04* e *T1D02*, *T1D01* e *T1D03*, entre outros; que formam áreas mais escuras na Figura 9.

Além disso, podemos observar o alto nível de correlação entre nossas amostras de pacientes e controles, com valores de correlação no intervalo de 0.96 a 1.0.

Figura 9. Agrupamento hierárquico resultante da aplicação do coeficiente de correlação de Pearson aos dados normalizados. Na legenda de intensidade de cor pode-se observar o alto nível de correlação entre as amostras (pacientes e controles).

7.4 Análise de Gene Sets (*Gene Set Analysis*)

A análise de *Gene Sets* (*Gene Set Analysis* – GSA) é um método computacional que avalia se um grupo de genes determinados *a priori* mostra diferenças estatisticamente significantes entre duas condições, por exemplo, controles e pacientes.

Tal método foi aplicado aos dados normalizados provenientes de nosso trabalho, resultando em 7715 símbolos gênicos únicos (*Gene Symbol*) contidos em 1454 gene sets, dos quais 146 possuem $p\text{-value} \leq 0.05$ (ANEXO D).

Dentre os 1454 *gene sets* foram escolhidos quatro para discussão, baseados na relevância biológica no contexto do DM1 e significância estatística ($p\text{-value} \leq 0.05$).

7.4.1 Gene set: *Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB*

O primeiro *gene set* escolhido foi *Cascata I-kappaB kinase/NF-kappaB*, que contém 104 genes (Tabela 4) e apresenta $p\text{-value}$ de 0.01.

Quando indivíduos afetados pelo DM1 foram comparados em relação aos controles, 43 transcritos apresentaram expressão induzida, enquanto 61 transcritos apresentaram expressão gênica reprimida neste *gene set*.

Podemos chamar a atenção para o valor de *fold change* do transcrito *TNF- α* , que foi o maior registrado neste trabalho.

Tabela 4. Transcritos que compõe o *gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB*, sua modulação e localização cromossômica.

Transcrito	Modulação*	Localização cromossômica
APOL3	1.24357627650153	22q12.3
ATP2C1	-1.44710639857593	3q22.1
BCL10	-1.53443283742332	1p22.3
BCL3	1.72778774929832	19q13.32
BIRC2	-1.40871229856755	11q22.2
BST2	-1.4144895809858	19p13.11
CANT1	1.26306032911372	17q25.3

Transcrito	Modulação*	Localização cromossômica
CARD10	-1.0182703876187	22q13.1
CARD8	-1.66358432906603	19q13.33
CARD9	2.38693495020613	9q34.3
CASP1	-1.51059194597742	11q22.3
CASP8	-1.38674545778889	2q33.1
CC2D1A	1.28031397519572	19p13.12
CD40	1.08645430671277	20q13.12
CFLAR	1.56827656431176	2q33.1
CHUK	-1.81502698787145	10q24.31
CXXC5	-1.60811713943096	5q31.2
ECM1	-1.83351351458167	1q21.3
ECT2	-1.41646190331979	3q26.31
EDARADD	1.1710186071241	1q43
EEF1D	1.00130535422795	8q24.3
ERC1	1.54281395441539	12p13.33
F2R	-1.22280554544488	5q13.3
FADD	-1.4186920862415	11q13.3
FAF1	1.27182220282485	1p32.3
FASLG	-2.8739381223086	1q24.3
FKBP1A	-1.13908231012216	20p13
FLNA	1.1873530724833	Xq28
GJA1	1.20317329401159	6q22.31
GOLT1B	-1.19296316683935	12p12.1
HMOX1	-1.43879993558844	22q12.3
HTR2B	-2.17869629157764	2q37.1
IKBKE	1.32573644710414	1q32.1
IKBKG	1.09587253283938	Xq28
IRAK1	1.5413441269964	Xq28
IRAK1BP1	-1.10211517606302	6q14.1
IRAK2	-1.06628980581445	3p25.3
LGALS1	-2.10594827176696	22q13.1
LGALS9	1.25193269169877	17q11.2
LITAF	1.1850508780527	16p13.13
LTBR	-1.05025161187196	12p13.31
MALT1	-1.36362835122076	18q21.32
MAP3K3	-1.11143994762259	17q23.3
MAP3K7	-1.26340921496794	6q15
MIB2	1.1189239625109	1p36.33
MIER1	-1.03980283945837	1p31.3
MYD88	1.32758961576668	3p22.2
NDFIP1	-1.13197139372801	5q31.3
NDFIP2	-1.61840591743998	13q31.1
NEK6	-1.19692520324378	9q33.3
NLRC3	-1.04188568878036	16p13.3
NOD1	1.05598731171254	7p14.3

Transcrito	Modulação*	Localização cromossômica
NOD2	-1.57290223317613	16q12.1
NUP62	-1.23216546019007	19q13.33
OTUD7B	1.118026938598	1q21.2
PLEKHG5	1.23561817741792	1p36.31
PLK2	1.65280440002317	5q11.2
PPM1A	-1.26577852805068	14q23.1
PPP5C	1.11401503210483	19q13.32
PRDX4	-1.30565252349512	Xp22.11
PTPLAD1	-1.3542254619869	15q22.31
REL	1.04638734636929	2p16.1
RELA	1.99292414620068	11q13.1
RHOA	-1.23245844171784	3p21.31
RHOC	-1.36894193065031	1p13.2
RHOH	-1.02269786959202	4p14
RIPK1	1.21211451127261	6p25.2
RIPK2	1.28271330102596	8q21.3
RPL17	-1.29473513964921	18q21.1
SECTM1	1.05621241174897	17q25.3
SLC20A1	-1.4347018928032	2q13
SLC35B2	1.22917642318805	6p21.1
SLC44A2	1.46392231793559	19p13.2
SQSTM1	1.00136372570106	5q35.3
STAT1	1.02590507688018	2q32.2
TBK1	-1.28030230533372	12q14.2
TFG	-1.0501762687539	3q12.2
TICAM1	-1.02055398521417	19p13.3
TLR6	-1.10482892828154	4p14
TMED4	-1.00274842490444	7p13
TMEM101	-1.08243020266847	17q21.31
TMEM9B	-1.32247733754351	11p15.4
TNF	8.72628204267965	6p21.33
TNFAIP3	6.80952775544857	6q23.3
TNFRSF10B	1.02520363569342	8p21.3
TNFRSF1A	-1.10200364821446	12p13.31
TNFSF10	-1.90586509110213	3q26.31
TNFSF14	-2.06978225289667	19p13.3
TNFSF15	-1.16034731719107	9q32
TRADD	-1.12104524034286	16q22.1
TRAF2	1.03793349011449	9q34.3
TRAF3IP2	1.34064015373293	6q21
TRAF5	-1.82550168445604	1q32.3
TRAF6	-1.20373786150299	11p12
TRIM13	-1.78683540981055	13q14.2
TRIM38	-1.23020990762727	6p22.2
TRIP6	1.06272771019533	7q22.1

Transcrito	Modulação*	Localização cromossômica
TSPAN6	-1.04842124967921	Xq22.1
UBE2N	-1.21544279979965	12q22
UBE2V1	1.17109693765951	20q13.13
VAPA	1.00905233326622	18p11.22
ZDHHC13	-2.1647378875177	11p15.1
ZDHHC17	1.2427550794956	12q21.2
ZNF675	-1.08943868347463	19p12

* A modulação do nível de expressão gênica se refere à comparação dos indivíduos afetados pelo DM1 em relação aos controles saudáveis.

Transcritos que compõe o *gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB* foram submetidos ao agrupamento hierárquico (Figura 10).

Figura 10. Agrupamento hierárquico de transcritos e amostras que compõe o *gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB*, comparando-se controles (barra azul) com pacientes diabéticos (barra cinza).

7.4.2 Gene set: Regulação da via de sinalização do receptor de TGF- β

O segundo *gene set* escolhido para discussão foi o de *Regulação da via de sinalização do receptor de TGF- β* , que contém 14 transcritos (Tabela 5) e apresenta *p-value* de 0.03.

Todos os transcritos que compõe esse *gene set* e são estatisticamente significantes em nossa análise apresentaram expressão gênica reprimida, com relação à comparação dos indivíduos afetados pelo DM1 em relação aos controles saudáveis.

Tabela 5. Transcritos que compõe o *gene set Regulação da via de sinalização do receptor de TGF- β* , sua modulação e localização cromossômica.

Transcritos	Modulação*	Localização cromossômica
CDKN1C	-1.47697008191259	11p15.5
CDKN2B	-1.28625361143228	9p21.3
CIDEA	-1.00921789858416	18p11.21
CITED2	-1.58787650803698	6q23.3
EID2	-1.22475778581726	19q13.2
ENG	-1.07305085185571	9q34.11
HIPK2	-1.2675071354286	7q34
IL17F	-1.06787138993922	6p12.2
PEG10	-1.06834959671806	7q21.3
SMAD2	-1.22157350760044	18q21.1
SMAD3	-1.03805288808902	15q22.33
SMAD4	-2.01205582982668	18q21.2
SNX6	-1.22286937164294	14q13.1
TGFB1	-1.15277108571453	19q13.1

* A modulação do nível de expressão gênica se refere à comparação dos indivíduos afetados pelo DM1 em relação aos controles saudáveis.

Transcritos que compõe o *gene set* *Regulação da via de sinalização do receptor de TGF- β* foram submetidos ao agrupamento hierárquico (Figura 11).

Figura 11. Agrupamento hierárquico de transcritos e amostras que compõe o *gene set* *Regulação da via de sinalização do receptor de TGF- β* , comparando-se controles (barra azul) com pacientes diabéticos (barra cinza).

7.4.3 Gene set: Regulação da cascata de JAK-STAT

O terceiro *gene set* escolhido foi o de *Regulação da cascata de JAK-STAT*, que contém 12 transcritos (Tabela 6) e apresenta *p-value* de 0.01.

Quando indivíduos afetados pelo DM1 foram comparados em relação aos controles, 04 transcritos apresentaram expressão reprimida, enquanto 08 transcritos apresentaram expressão gênica induzida neste *gene set*.

Tabela 6. Transcritos que compõe o *gene set* *Regulação da cascata de JAK-STAT*, sua modulação e localização cromossômica.

Transcritos	Modulação*	Localização cromossômica
CLCF1	1.00034451369331	11q13.2
HCLS1	-1.37334963187201	3q13
HGS	1.34156079598386	17q25.3
IL12A	1.31276574107727	3q25.33
IL20	1.37561052014369	1q32.1
IL22RA2	-1.07798389986147	6q23.3
IL29	-1.57403750148252	19q13.2
IL31RA	1.05643779599822	5q11.2
LYN	1.1671409213542	8q13
NF2	1.63190140265721	22q12.2
PIGU	-1.1178669677976	20q11.22
SOCS1	1.81889973565206	16p13.13

* A modulação do nível de expressão gênica se refere à comparação dos indivíduos afetados pelo DM1 em relação aos controles saudáveis.

Transcritos que compõe o *gene set Regulação da cascata de JAK-STAT* foram submetidos ao agrupamento hierárquico (Figura 12).

Figura 12. Agrupamento hierárquico de transcritos e amostras que compõe o *gene set Regulação da cascata de JAK-STAT*, comparando-se controles (barra azul) com pacientes diabéticos (barra cinza).

7.4.4 Gene set: Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas

O quarto *gene set* escolhido foi o de *Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas*, que contém 22 transcritos (Tabela 7) e apresenta *p-value* de 0.05.

Quando indivíduos afetados pelo DM1 foram comparados em relação aos controles, 14 transcritos apresentaram expressão reprimida, enquanto 08 transcritos apresentaram expressão gênica induzida neste *gene set*.

Tabela 7. Transcritos que compõe o *gene set Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas*, sua modulação e localização cromossômica.

Transcritos	Modulação*	Localização cromossômica
CCR2	-2.18081693551544	3p21.31
CD24	-1.56131776177875	Yq11.222
COMMD7	1.07380119988077	20q11.21
CX3CL1	-1.10651122006917	16q21
DUOX1	1.04700071834565	15q21.1
DUOX2	-1.27867185391883	15q21.1
EREG	3.02875230158876	4q13.3
IFNK	1.38675047487899	9p21.2
IL2RB	-1.80102834688433	22q13.1
IL31RA	1.05643779599822	5q11.2
IRAK3	-1.10622884282373	12q14.3
NUP85	-1.14082263016654	17q25.1
PF4	-1.64759639242613	4q12-q21
PTPRC	-1.70216621573642	1q31.3
PYCARD	-1.51913240998138	16p11.2
PYDC1	1.08600394578138	16p11.2
RELA	1.55872727460493	11q13.1
SIGIRR	-1.21178835744814	11p15.5
SOCS1	1.81889973565206	16p13.13
SOCS5	-1.35736001276922	2p21
TNFRSF1A	-1.24024399867749	12p13.31
ZNF675	-1.09417593541702	19p12

* A modulação do nível de expressão gênica se refere à comparação dos indivíduos afetados pelo DM1 em relação aos controles saudáveis.

Transcritos que compõe o *gene set Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas* foram submetidos ao agrupamento hierárquico (Figura 13).

Figura 13. Agrupamento hierárquico de transcritos e amostras que compõe o *gene set Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas*, comparando-se controles (barra azul) com pacientes diabéticos (barra cinza).

7.5 Seleção de marcadores transcricionais preferencialmente expressos em tipos celulares encontrados no sistema imune

Análises de expressão gênica por *microarrays*, por causa da amplitude sem precedentes dos dados gerados, contém uma promessa única para elucidação da organização funcional de diversos tipos celulares, tais como as que compõem o sistema imune (HYATT et al., 2006).

O banco de dados *ImmGen* é resultado do esforço de um grupo colaborativo de imunologia e laboratórios de biologia computacional que visa decifrar, em grande escala, os padrões de expressão dos genes e redes reguladoras gênicas do sistema imune do camundongo e humano (HENG et al., 2008; PAINTER et al., 2011; BENOIST et al., 2012).

Os genes contidos nos 04 *gene sets* selecionados no presente trabalho foram submetidos a um *screening* (exemplo utilizando o gene CDKN1C, Figura 14) utilizando a ferramenta Gene Skyline, fornecida pelo banco de dados *Immunological Genome Project Database* (disponível em <http://www.immgen.org>), com o intuito de selecionar marcadores transcricionais que estariam preferencialmente expressos em tipos celulares encontrados no sistema imune. O banco de dados selecionado dentro da ferramenta *Gene Skyline* foi o *Human Hematopoietic (D-Map)* (Tabela 9).

Após a identificação dos transcritos que foram considerados como marcadores transcricionais, selecionamos transcritos que foram agrupados juntos com esse marcador (Tabela 10). Estes transcritos que mostraram perfil de expressão semelhante, e de acordo com a definição do agrupamento hierárquico, devem participar de função biológica semelhante e provavelmente estariam expressos em um mesmo tipo celular (EISEN et al., 1998).

Somente os tipos celulares encontrados no sangue periférico foram considerados (PBMCs). (Tabela 8).

Figura 14 - Gráfico ilustrativo gerado pelo banco de dados IMMGEN (<http://www.immgen.org/>) mostrando a representação do perfil de expressão do gene CDKN1C em diversos tipos celulares onde esse gene é expresso. Somente genes que mostraram perfil de expressão comparativamente exacerbado foram selecionados como marcadores transcricionais.

Tabela 8. Legenda dos tipos celulares disponíveis no banco de dados IMMGEN (<http://www.immgen.org/>) e demonstrados na Figura 13.

Símbolo celular	Descrição
B.27+.BI	Células B maduras de sangue periférico que sofreram mudança de classe
B.27+IgD+.BI	Células B maduras de sangue periférico capazes de mudar de classe
B.BI	Células B maduras de sangue periférico
B.Nve.BI	Células B naive de sangue periférico
DC.BI	Célula dendrítica mielóide do sangue periférico
DC.pDC.BI	Célula dendrítica plasmocitóide do sangue periférico
earlyB.BI	Célula B inicial de cordão umbilical
GB.BI	Basófilos de cordão umbilical
GE.BI	Eosinófilos de cordão umbilical
GN.CFU.BI	Granulócito (união formadora de colônia) de cordão umbilical
GN.Met.BI	Granulócito (metamielócito) de cordão umbilical
GN.BI	Granulócito de cordão umbilical
MK.BI	Megacariócito de cordão umbilical
MK.CFU.BI	Megacariócito (unidade formadora de colônia) de cordão umbilical
Mo.BI	Monócito de cordão umbilical
Mo.CFU.BI	Monócito (unidade formadora de colônia) de cordão umbilical
NK.56+16+.BI	Célula Natural killer (CD56+ CD16+) de sangue periférico
NK.56-16-.BI	Célula Natural killer (CD56- CD16-) de sangue periférico
NK.56-16+.BI	Célula Natural killer (CD56- CD16+) de sangue periférico
NKT.BI	Célula NKT de sangue periférico
proB.BI	Progenitor de célula B de cordão umbilical
RBC.GlyA+34-71-.BI	Célula eritróide (CD34- CD71- GlyA+) de cordão umbilical
RBC.GlyA+34-71+.BI	Célula eritróide (CD34- CD71+ GlyA+) de cordão umbilical
RBC.GlyA+34-71lo.BI	Célula eritróide (CD34- CD71lo GlyA+) de cordão umbilical
RBC.GlyA-34+71+.BI	Célula eritróide (CD34+ CD71+ GlyA-) de cordão umbilical
RBC.GlyA-34-71+.BI	Célula eritróide (CD34- CD71+ GlyA-) de cordão umbilical
SC.CMP.BI	Progenitor mielóide comum de cordão umbilical
SC.GMP.BI	Progenitor de granulócito/macrófago de cordão umbilical
SC.LT34F.BI	Célula tronco hematopoiética CD133+ CD34dim de cordão umbilical
SC.MEP.BI	Progenitor eritróide/megacariócito de cordão umbilical
SC.ST34F.BI	Célula tronco hematopoiética CD38+ CD34+ de cordão umbilical
T.4Eff.BI	Células T CD4+ de memória efetoras de sangue periférico
T.4Mem.BI	Células T CD4+ de memória central de sangue periférico
T.4Nve.BI	Células T CD4+ naive de sangue periférico
T.8Eff.BI	Células T CD8+ de memória efetoras de sangue periférico
T.8Mem.BI	Células T CD8+ de memória central de sangue periférico
T.8Nve.BI	Células T CD8+ naive de sangue periférico

Tabela 9. Marcadores transcricionais preferenciais para tipo celular presente no sistema imune, selecionados para cada gene set discutido no trabalho.

Gene set	<i>Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB</i>	
Gene	Tipo celular	Grupo celular
CD40	Células B <i>naïve</i> de sangue periférico	Células B
	Células B maduras de sangue periférico	Células B
	Células B maduras de sangue periférico capazes de mudar de classe	Células B
	Células B maduras de sangue periférico que sofreram mudança de classe	Células B
F2R	Células <i>Natural killer</i> (CD56+ CD16+) de sangue periférico	Células NK
	Células T CD8+ de memória efetoras de sangue periférico	Células T CD8+
FASLG	Células <i>Natural killer</i> (CD56+ CD16+) de sangue periférico	Células NK
	Células T CD8+ de memória efetoras de sangue periférico	Células T CD8+
HMOX1	Células <i>Natural killer</i> (CD56- CD16+) de sangue periférico	Células NK
TNF	Células <i>Natural killer</i> (CD56- CD16+) de sangue periférico	Células NK
	Células NKT de sangue periférico	Células NKT
TNFAIP3	Células T CD4+ de memória efetoras de sangue periférico	Células T CD4+
	Células T CD8+ de memória efetoras de sangue periférico	Células T CD8+
TRADD	Células T CD4+ de memória central de sangue periférico	Células T CD4+
	Células T CD4+ de memória efetoras de sangue periférico	Células T CD4+
Gene set	<i>Regulação da via de sinalização do receptor de TGF-β</i>	
Gene	Tipo celular	Grupo celular
CDKN1C	Células <i>Natural killer</i> (CD56- CD16+) de sangue periférico	Células NK
Gene set	<i>Regulação da cascata de JAK-STAT</i>	
Gene	Tipo celular	Grupo celular
IL12A	Células B <i>naïve</i> de sangue periférico	Células B
	Células B maduras de sangue periférico	Células B
	Células B maduras de sangue periférico capazes de mudar de classe	Células B
Gene set	<i>Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas</i>	
Gene	Tipo celular	Grupo celular
IL2RB	Células <i>Natural killer</i> (CD56+ CD16+) de sangue periférico	Células NK

Tabela 10. Marcadores transcricionais preferencialmente expressos em tipos celulares encontrados no sistema imune e respectivos transcritos que mostraram perfil de expressão semelhante, selecionados em cada gene set discutido no trabalho.

Gene set	<i>Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB</i>	
Gene	Genes com perfil de expressão semelhante	Grupo celular
CD40	BST2	Células B
	PTPLAD1	Células B
F2R	CANT1	Células NK
		Células T CD8+
FASLG	PRDX4	Células NK
		Células T CD8+
HMOX1	TRIM13	Células NK
TNF	PPP5C	Células NK
		Células NKT
TNFAIP3	ZDHHC17	Células T CD4+
		Células T CD8+
TRADD	LTBR	Células T CD4+
	FKBP1A	Células T CD4+
Gene set	<i>Regulação da via de sinalização do receptor de TGF-β</i>	
Gene	Genes com perfil de expressão semelhante	Grupo celular
CDKN1C	IL17F	Células NK
Gene set	<i>Regulação da cascata de JAK-STAT</i>	
Gene	Genes com perfil de expressão semelhante	Grupo celular
IL12A	IL31RA	Células B
Gene set	<i>Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas</i>	
Gene	Genes com perfil de expressão semelhante	Grupo celular
IL2RB	SIGIRR	Células NK

7.6 Confirmação dos dados de expressão obtidos por microarrays por PCR em tempo real

A reação de PCR em tempo real foi utilizada para confirmação dos dados de *microarrays* para três genes presentes em *gene sets* discutidos no trabalho: *IL2RB* (presente no *gene set Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas*), *TNF* (presente no *gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB*) e *NOD2* (presente no *gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB*). O gene *HPRT* foi usado como controle endógeno.

Os gráficos foram construídos de acordo com os valores de RQ (*Relative Quantification – Expressão Relativa*).

Os dados de *microarrays* para o gene *IL2RB* demonstraram uma diminuição de sua expressão nos pacientes afetados pelo DM1 em relação aos controles saudáveis, fato confirmado pela reação de PCR em tempo real demonstrada na Figura 15.

Figura 15. Reação de PCR em tempo real para avaliação dos níveis de expressão do gene *IL2RB* em controles saudáveis e pacientes afetados pelo DM1 (Teste estatístico utilizado: teste t, $p \leq 0.05$).

Os dados de *microarrays* obtidos para o gene *NOD2* demonstraram uma diminuição de sua expressão nos pacientes afetados pelo DM1 em relação aos controles, fato confirmado pela reação de PCR em tempo real demonstrada na Figura 16.

Figura 16. Reação de PCR em tempo real para avaliação dos níveis de expressão do gene *NOD2* em controles saudáveis e pacientes afetados pelo DM1 (Teste estatístico utilizado: teste t, $p \leq 0.00001$).

Os dados de *microarrays* obtidos para o gene *TNF* demonstraram aumento de sua expressão nos pacientes afetados pelo DM1 em relação aos controles saudáveis, fato confirmado pela reação de PCR em tempo real demonstrada na Figura 17.

Figura 17. Reação de PCR em tempo real para avaliação dos níveis de expressão do gene *TNF* em controles saudáveis e pacientes afetados pelo DM1 (Teste estatístico utilizado: teste t, $p \leq 0.005$).

O padrão de expressão dos dados estatisticamente significativos dos genes analisados por *microarrays* encontra-se semelhante aos dados estatisticamente significativos gerados por PCR em tempo real, sendo considerados confirmados.

7.6.1 Modulação da expressão gênica obtida a partir das análises de PCR em tempo real

A modulação da expressão gênica das análises de PCR em tempo real foi obtida a partir dos valores de *fold change* provenientes da razão da expressão relativa entre pacientes afetados pelo DM1 e controles saudáveis (Tabela 11).

Tabela 11. Modulação da expressão gênica obtida a partir das análises de PCR em tempo real

Gene	Modulação
IL2RB	-2.03
NOD2	-2.36
TNF	7.35

* A modulação do nível de expressão gênica se refere à comparação dos indivíduos afetados pelo DM1 em relação aos controles saudáveis.

7.6.2 Coeficiente de correlação de Pearson resultante da comparação entre os valores de *fold change* dos dados provenientes dos *microarrays* e PCR em tempo real

O cálculo do coeficiente de correlação de Pearson entre os valores de *fold change* dos dados provenientes dos *microarrays* e PCR em tempo real resultou em uma correlação (ρ) de 0.9988 ($p \leq 0.000001$).

DISCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram utilizadas PBMCs humanas na comparação dos dados de *microarrays* entre pacientes com DM1 e controles saudáveis, uma vez que essas células apresentam potencial para responder às mudanças no corpo e em seu ambiente, atuando como células-repórter e sendo informativas em relação a eventos fisiológicos e patológicos no organismo (REYNER et al., 2010).

Além de tudo, PBMCs caracterizam um tecido ideal, de fácil obtenção e capaz de fornecer um grande *pool* sob a forma de transcritos gênicos, pois expressam grande proporção dos genes codificados no genoma humano (LIEW et al, 2006; REYNIER et al., 2010).

Com o intuito de observar o perfil de expressão gênica de todos os dados de *microarray* normalizados, realizou-se o agrupamento hierárquico não supervisionado destes dados, que englobam 20.664 transcritos.

O agrupamento hierárquico é amplamente utilizado para a análise de dados de expressão gênica, pois é uma abordagem aglomerativa, na qual os perfis de expressão individuais de maior semelhança são unidos para formar grupos, que são unidos novamente até que o processo tenha sido concluído, com a formação de uma única árvore hierárquica (EISEN et al., 1998).

Em nossos resultados podemos observar uma clara separação entre as amostras de controles e as amostras de pacientes, possibilitando a distinção entre pacientes e controles saudáveis baseada no perfil de expressão gênica global resultante do agrupamento hierárquico de amostras e transcritos.

Além do agrupamento hierárquico dos dados de *microarrays* normalizados, realizou-se o cálculo do coeficiente de correlação de Pearson e o agrupamento hierárquico dos coeficientes de correlação de Pearson entre as amostras de controles saudáveis e pacientes afetados pelo DM1.

A correlação obtida entre pacientes e controles foi positiva, demonstrando mudanças proporcionais na expressão gênica entre as amostras. Podemos observar através do agrupamento hierárquico dos coeficientes de correlação de Pearson que os controles formam um grupo que apresenta altíssima correlação entre si, provavelmente por representarem triplicatas do pool de amostras de controles.

Existem também grupos de amostras de pacientes agrupados e que possuem maior correlação entre si do que com outros pacientes e controles, demonstrando que mesmo entre um grupo de pacientes afetados pela mesma doença autoimune são observadas diferenças de expressão gênica transcricional.

Além disso, foi possível observar que as pacientes *T1D13* e *T1D17*, ambas do sexo feminino, possuem a menor correlação entre si do que com qualquer outra amostra (controle ou paciente) do agrupamento hierárquico dos coeficientes de correlação de Pearson. Com base nos dados clínicos obtidos destes pacientes uma possível explicação para essa diferença pode ser a diferença de idade entre as duas pacientes (paciente *T1D17* tem 25 anos e a paciente *T1D13* tem 37 anos); e a diferença nas porcentagens de HbA1c (hemoglobina glicosilada), pois a paciente *T1D13* possui níveis mais baixos de HbA1c.

A correlação do perfil de expressão gênica de pacientes com base em dados clínicos e demográficos é muito difícil em uma doença como DM1, dada sua complexidade e caráter multifatorial.

Além disso, neste estudo foi realizada uma análise de GSA, método desenvolvido por *Efron & Tibshirani* em 2006, como uma melhoria do método GSEA desenvolvido por *Subramanian et al.* em 2005. Este método baseia-se na avaliação da significância estatística de *gene sets* pré-definidos, ao invés de genes individuais, uma boa escolha analítica para uma doença poligênica como o DM1.

Os *gene sets* podem ser derivados a partir de diferentes fontes, como por exemplo, *gene sets* que representam processos biológicos. O ponto central de tal ideia é que tais *gene sets* estão muito relacionados e, portanto, apresentarão padrões de expressão similares.

Outro aspecto positivo deste método analítico é o potencial para aumento do poder estatístico quando *gene sets* são analisados, ao invés de genes de forma separada. Além disso, ao comparar os resultados dos estudos sobre a mesma doença em laboratórios diferentes, pode-se obter maior reprodutibilidade com uma análise baseada em *gene sets* do que a partir de genes específicos, devido à variabilidade biológica e técnica (BILD et al., 2005; FEBBO et al., 2005; SUBRAMANIAN et al, 2005; EFRON & TIBSHIRANI, 2010).

8.1 Gene set: *Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB*

O maior *gene set* resultante da análise de GSA em nosso estudo corresponde à cascata de *I Kappa B Kinase/NF Kappa B*.

Este gene set compreende diversos transcritos envolvidos na família de fatores de transcrição de NF-kB, que são normalmente mantidos inativos no citoplasma através da interação com moléculas inibidoras da família IκB. Em resposta a estímulos múltiplos, tais como as citocinas inflamatórias, produtos bacterianos ou virais, ou diversos tipos de stress, as moléculas IκB tornam-se fosforiladas e esta modificação permite a sua poliubiquitinação e destruição pelo proteassoma. Como consequência, dímeros de NF-kB liberados são translocados para o núcleo, ligam-se às sequências de DNA específicas e promovem a transcrição de genes-alvo que participam na resposta imunológica e inflamatória, adesão celular, controle de crescimento e proteção contra a apoptose (BAUERLE & HENKEL, 1994; ISRAEL et al., 2010; OECKINGHAUS et al. 2011; HAYDEN & GOSH, 2012).

Os transcritos que fazem parte do *gene set cascata de I Kappa B Kinase/ NF Kappa B* foram submetidos a um *screening* utilizando a ferramenta *Gene Skyline*, fornecida pelo banco de dados *Immunological Genome Project* (disponível em <http://www.immgen.org>), para a seleção de marcadores transcricionais preferencialmente expressos em tipos celulares encontrados no sistema imune. Os transcritos que apresentam perfil de marcadores transcricionais neste *gene set* são os seguintes: *CD40*, *F2R*, *FASLG*, *HMOX1*, *TNF*, *TNFAIP3* e *TRADD*.

CD40 é membro da família de receptores de *TNF*, expresso em uma grande variedade de células imunológicas, geralmente associado às células apresentadoras de antígeno. *In vivo*, a ligação cruzada de *CD40* ao seu ligante *CD154* (expresso em células T), induz a maturação de células B em células B produtoras de anticorpos e resulta em troca de classe de isótipo (MAURI & BOSMA, 2012; BALASA et al., 1997; DURIE et al., 1993; KOBATA et al., 2000; QUEZADA et al., 2003; TOUBI & SHOENFELD, 2004; VAITAITIS & WAGNER, 2008; XIE et al., 2006).

Interações *CD40-CD154* podem influenciar em muitos aspectos as respostas das células T, pois a co-estimulação via *CD40* aumenta a função de apresentação de antígenos por células B e induz a expressão das moléculas co-estimuladoras B7-

1 e B7-2. Sinalização por *CD40* também ativa a produção de citocinas inflamatórias e intermediários reativos de nitrogênio por macrófagos. Além disso, a ligação *CD40* - *CD154* é intensamente estudada e conhecida por ser crítica na instalação e perpetuação da autoimunidade. Evidências provenientes de estudos realizados em modelos animais mostram que interações *CD40-CD154* são essenciais para o desenvolvimento de várias doenças autoimunes, tais como artrite induzida por colágeno e a encefalomielite alérgica experimental. A co-estimulação através de *CD40-CD154* é necessária para a geração e *homing* de células T autorreativas específicas para antígenos de ilhotas pancreáticas, sendo esta apresentação de autoantígenos às células T necessária para o desenvolvimento do DM1 (BALASA et al., 1997; VAITAITIS & WAGNER, 2010; KNIP et al., 2008).

A partir do *screening* utilizando a ferramenta *Gene Skyline*, este transcrito foi caracterizado como marcador transcricional preferencialmente expresso em células B. Em nosso estudo o *CD40* apresentou-se induzido, o que significa que houve um aumento discreto na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Uma possível interpretação desta discreta indução em *CD40* seria de que nossos pacientes de DM1 possuem a doença há alguns anos, ou seja, o período de apresentação de autoantígenos às células T autorreativas e consequentemente a maior indução deste gene já ocorreram à época da instalação da doença. Além disso, interações entre *CD40* e seu ligante pode constituir um importante mediador da inflamação vascular que leva ao início de microangiopatia diabética, além de também poder contribuir para os processos inflamatórios que levam à aterosclerose e trombose (EL-ASRAR et al., 2012).

Além da busca por marcadores transcricionais preferencialmente expressos em células do sistema imune, foi realizada uma busca por genes que apresentassem perfil de expressão gênica semelhante a esses marcadores transcricionais no agrupamento hierárquico de cada *gene set*.

Os transcritos com modulação semelhante ao *CD40* no agrupamento hierárquico são: *BST2* e *PTPLAD1*.

BST2 foi inicialmente identificado por dois grupos de pesquisa independentes, que estavam em busca de novos marcadores de superfície de células B normais terminalmente diferenciadas e neoplásicas (GOTO et al., 1994 ; ISHIKAWA et al., 1995).

O transcrito *BST2* codifica uma glicoproteína transmembrana do tipo II que tem um grande domínio extracelular contendo dois sítios de N-glicosilação e três resíduos de cisteína, existindo como um dímero com uma topologia única, em virtude de uma âncora GPI na região C-terminal. Tem sido sugerido que *BST2* está envolvido no crescimento de células pré-B e no desenvolvimento de células plasmacitóides no mieloma múltiplo. Além disso, *BST2* também pode inibir a produção de IFN- γ e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- α por células dendríticas humanas plasmacitóides. Essa inibição é conseguida pela ligação de *BST2* ao receptor ILT7, que é expresso exclusivamente em células dendríticas humanas plasmacitóides. Esta interação estabelece um circuito de retroalimentação negativa no qual *BST2* induzido por IFN- γ leva à inibição de IFN- γ e citocinas pró-inflamatórias. Além disso, *BST2* pode também desempenhar um papel na regulação de células imunes inatas (DOUGLAS et al., 2010; YOO et al., 2011).

Em nosso estudo o *BST2* apresentou-se reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Uma diminuição da expressão de *BST2* nos pacientes poderia indicar uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias. O aumento da inflamação pode contribuir para complicações relacionadas ao DM1, como a aterosclerose, onde níveis elevados de marcadores inflamatórios podem estar associados a um perfil lipídico aterogênico em pacientes com DM1 (SNELL-BERGEON et al., 2010).

O outro transcrito com expressão semelhante ao *CD40* é o *PTPLAD1*, também é conhecido como *B-IND1*. O mRNA de *B-IND1* foi encontrado expresso em todos os tecidos de camundongo examinados e o homólogo humano codifica uma proteína de 370 aminoácidos, sem motivos funcionais conhecidos. No entanto, experimentos mostram que *B-IND1* atua em vias bioquímicas, podendo levar à ativação de NF- κ B e influenciar na regulação da expressão gênica (SABBAH et al., 2006; COURILLEAU et al., 2000).

Em nosso estudo o *PTPLAD1* (*B-IND1*) apresentou-se reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Com base na diminuição da expressão de *PTPLAD1* nos pacientes, uma possível interpretação seria de que este transcrito não estaria associado à ativação da via de NF- κ B ou participando na regulação da expressão gênica, mas poderia

participar em outros processos biológicos, para os quais sua participação ainda não foi relatada.

No presente estudo, foram encontrados dois transcritos que podem ser classificados como marcadores transcricionais preferencialmente expressos em células NK e células T CD8⁺: *FASLG* e *F2R*. Existem evidências consideráveis de que as células T têm um papel importante no desenvolvimento e progressão de DM1 em humanos e em modelos animais. As células T podem mediar a morte de células beta a partir de diversos mecanismos, tais como: citotoxicidade mediada por MHC de classe I, produção de citocinas por células T CD4⁺ e CD8⁺ (como por exemplo, IFN- γ , que induz a expressão do receptor de morte FAS), e produção de quimiocinas pelas células beta. Ativação de FAS por células T ativadas expressando seu ligante *FASLG* poderiam iniciar a apoptose de células beta e a inflamação é aumentada pela produção de quimiocinas pelas células beta, o que resulta na progressão do recrutamento de células mononucleares para o local. Além disso, o IFN- γ produzido por essas células pode ativar macrófagos e induzir a produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e TNF- α . As células NK participam na proteção precoce contra vírus e estão envolvidas na morte de células infectadas e de tumores. As células NK são citotóxicas e produtoras de citocinas, em particular IFN- γ e poderiam, assim, contribuir direta ou indiretamente na destruição de células beta pancreáticas. As células NK foram detectadas no pâncreas de pacientes com DM1 e em diversos modelos animais de DM1 (DOTTA et al 2007; PHILLIPS et al, 2009; BRAUNER et al, 2010; LEHUEN et al, 2010).

Em nosso estudo, o transcrito *FASLG* apresentou-se reprimido, o que significa que houve diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Este resultado poderia ser relacionado ao fato de que os pacientes estudados possuem a doença há alguns anos e de que a destruição massiva das células beta pancreáticas (e, conseqüentemente, a maior expressão de *FASLG*) já possa ter ocorrido durante a instalação da doença (NAKAYAMA et al, 2002, PETROVSKY et al, 2002).

O transcrito com modulação semelhante ao *FASLG* no agrupamento hierárquico é *PRDX4*, que codifica uma enzima antioxidante, chamada AOE372.

Os organismos vivos produzem espécies reativas de oxigênio, tais como H₂O₂, durante os processos fisiológicos e, em resposta a estímulos externos, tais

como a radiação UV. No entanto, existem mecanismos bioquímicos que acabam protegendo as células das espécies reativas de oxigênio. Um delicado equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é importante especialmente para a homeostase. Várias evidências sugerem que a regulação redox intracelular, um processo altamente conservado em organismos que vão desde bactérias a humanos, é um mecanismo de controle versátil na transdução de sinal e expressão gênica. Em células de mamíferos, o estado redox intracelular tem sido associado à diferenciação celular, resposta imune, controle do crescimento e apoptose. Antioxidantes governam o estado redox intracelular, sendo que a via de NF- κ B é regulada por processos redox e esta peroxiredoxina, AOE372 está envolvida em sua regulação (STAAL et al., 1995; JIN et al., 1997).

Em nosso estudo, o transcrito *PRDX4* apresentou-se reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

O resultado obtido pode estar relacionado ao fato observado por *Jin et al.*, de que a ausência ou o baixo nível de expressão de AOE372 em leucócitos sanguíneos e em órgãos linfoides primários (timo e baço) sugere a possibilidade de que em alguns tipos celulares os antioxidantes podem necessitar ser menos controlados, de forma a permitir a execução de suas funções primárias (JIN et al., 1997).

O transcrito *F2R* também é conhecido como *PAR1*, e a proteína codificada por este gene é o receptor da protease ativada (PAR1), uma proteína transmembrana que transduz respostas celulares para serina proteases geradas pelas vias de coagulação e anticoagulação. A trombina é a protease efetora chave da via de coagulação e liga-se diretamente a PAR1, levando à sua ativação sobre as células endoteliais. O resultado é a quebra da barreira endotelial, aumento da permeabilidade vascular e migração celular (McCOY et al., 2010; SOH et al., 2011; TREJO et al., 2011).

Em nosso estudo, o transcrito *F2R* apresentou-se reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Este resultado pode estar associado à diminuição na permeabilidade vascular e migração celular nestes pacientes, pois indivíduos com DM1 exibem uma condição pró-inflamatória/pró-coagulante decorrente da adesividade plaquetária aumentada,

da ativação do sistema de coagulação e diminuição do potencial fibrinolítico plasmático (TARGHER et al., 2011).

O transcrito com modulação semelhante ao *F2R* no agrupamento hierárquico é *CANT1*.

Foram identificadas mutações no gene *CANT1* em famílias que apresentam a displasia de *Desbuquois* (DBQD), uma condrodisplasia autossômica recessiva, caracterizada por grave retardo do crescimento pré-natal e pós-natal, frouxidão articular, extremidades curtas e escoliose progressiva (HUBER et al., 2009; LACCONE et al., 2011).

No presente trabalho o transcrito *CANT1* apresentou-se induzido, o que significa que houve um aumento na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

A função da nucleotidase solúvel codificada por *CANT1* e sua associação com o DM1 ainda são desconhecidas.

O transcrito *HMOX1* pode ser classificado como marcador transcricional preferencialmente expresso em células NK. A proteína codificada por ele é a enzima heme oxigenase-1 (HO-1) de resposta ao estresse, que catalisa a degradação do heme a ferro livre, monóxido de carbono (CO) e biliverdina em células de mamíferos. Existem evidências de uma função imunomoduladora para HO-1, sendo que o aumento da expressão de HO-1 previne a rejeição de enxertos em transplantes de órgãos. O efeito benéfico da HO-1 é, muito provavelmente, através inibição da maturação de células dendríticas, limitando assim a ativação das células T e o padrão de resposta Th1. Além disso, existem evidências de que HO-1 exibe um efeito protetor em camundongos NOD, desacelerando a progressão do diabetes neste modelo animal (HU et al., 2007).

Em nosso estudo, o transcrito *HMOX1* apresentou-se reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Este resultado pode estar associado à regulação imune prejudicada nos pacientes afetados pelo DM1, o que pode ter facilitado o aparecimento da doença autoimune e também estar relacionado a complicações ainda não associadas.

O transcrito com modulação semelhante ao *HMOX1* no agrupamento hierárquico é *TRIM13*.

Muitos membros da superfamília TRIM são expressos em resposta a interferons e estão envolvidos em uma ampla gama de processos biológicos associados com a imunidade inata (REYMOND et al., 2001; RAJSBAUM et al., 2008).

As proteínas TRIM estão presentes em todos os metazoários, mas o número de membros da família varia entre espécies, sendo que o maior grupo se encontra em humanos (65 proteínas). *TRIM13* está localizada no retículo endoplasmático, mas seu papel na regulação da autofagia ou sua relação com a degradação proteica autofágica e o estresse induzido no retículo endoplasmático ainda não está claro.

A autofagia é um mecanismo seletivo para degradar proteínas e organelas celulares defeituosas. O papel da autofagia está se tornando mais evidente na regulação das respostas ao estresse intra e extracelular importantes para a homeostase celular. Autofagia desempenha um papel crucial na oncogênese e progressão do câncer, apresentação de antígenos, sinalização da resposta imune inata e *clearance* de patógenos. Muitas condições degenerativas como doença de Huntington, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer e diabetes são devidas a defeitos no *clearance* de agregados de proteínas mutantes ou organelas com defeito através de autofagia (LERNER et al., 2007; OZATO et al., 2008; MOSCAT et al., 2009; TOMAR et al., 2012).

Em nosso estudo, o transcrito *TRIM13* apresentou-se reprimido, o que significa que houve diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Este resultado pode indicar que defeitos no sistema de autofagia e *clearance* de proteínas e organelas defeituosas poderiam contribuir com o surgimento e progressão do DM1. Além disso, estudos clínicos e em modelos animais demonstram evidências de que o estresse do retículo endoplasmático pode estar associado às complicações cardiovasculares em pacientes com DM1 (GALÁN et al., 2012)

O transcrito *TNF- α* pode ser classificado como marcador transcricional preferencialmente expresso em células NK e NKT.

Como descrito anteriormente, células NK participam na proteção precoce contra vírus e estão envolvidas na morte de células infectadas e de tumores. As células NK são citotóxicas e produtoras de citocinas, em particular IFN- γ e poderiam, assim, contribuir direta ou indiretamente para a destruição de células beta. Já as

células NKT são um subconjunto de linfócitos que fazem uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa. Essas células possuem receptores de células T (TCR) em sua superfície para o reconhecimento de antígenos glicolípidicos e também receptores de células NK. Essas células desempenham um papel significativo na tolerância periférica e proteção contra doenças autoimunes e outras, incluindo câncer, infecções bacterianas, parasitárias, fúngicas e virais. São capazes de regular a imunidade através da liberação de citocinas e de atividade citolítica. Uma vez ativadas, as células NKT podem produzir rapidamente grandes quantidades de citocinas, incluindo o IFN- γ , IL4, IL2, IL10, TNF- α , IL13, e quimiocinas (BENDELAC et al., 2007; ISSAZADEH-NAVIKAS, 2012).

TNF- α induz derrame vascular, tem efeitos inotrópicos negativos (reduz força e frequência dos batimentos cardíacos) e é o principal mediador endógeno do choque tóxico e sepse. Além dos fagócitos mononucleares, diversos tipos celulares podem produzir TNF- α : neutrófilos, linfócitos ativados, células NK, células endoteliais e mastócitos (BORISH & STEINKE, 2003).

TNF- α e β estão localizados na região central do HLA e foram relacionados a numerosos polimorfismos, sendo que existem evidências associando estes polimorfismos com a susceptibilidade ao DM1. Além disso, TNF- α e β medeiam uma variedade de funções do sistema imune e os seus papéis na inflamação e na biologia dos linfócitos têm sido bem documentados (HAMAGUCHI et al., 2000; BOUQBIS et al., 2006; SHIN et al., 2008).

Sabe-se que o DM1 já diagnosticado há alguns anos é uma doença inflamatória crônica, que se manifesta por níveis detectáveis de marcadores séricos de inflamação, um dos quais é o TNF- α . Vários estudos têm demonstrado a associação entre o nível sérico de TNF- α e gravidade do DM1. O nível de TNF- α positivamente correlacionado com distúrbios metabólicos, controle glicêmico, e juntamente com a duração do DM1, pode ser utilizado como um fator determinante independente para complicações diabéticas microvasculares (TARGHER et al., 2005; RONCAROLO et al., 2007; ZORENA et al., 2007; RYBA et al., 2011).

Níveis progressivamente aumentados de TNF são observados em pacientes com DM1 que apresentam controle metabólico insatisfatório, sugerindo possível correlação entre os níveis de TNF e o nível de proteínas glicosiladas nesses pacientes (FOSS et al., 1992).

Do mesmo modo, o DM1 é associado com aumento do risco de lesão hepática crônica (KIM et al., 2009). Hepatócitos são capazes de responder a citocinas pró-inflamatórias que promovem a expressão de genes que medeiam a resposta inflamatória (MARTIN-SANZ et al., 2002). Foram encontrados no sangue de pacientes com DM1 um aumento significativo das citocinas IL6, IL18, IL1 e TNF- α (ESPOSITO et al., 2002; FOSS et al., 2007). Uma das principais citocinas liberadas é TNF- α , que pode interagir com o receptor TNF-R1 e, portanto, pode promover a ativação da via de NF-kB ou iniciar a via de ativação de caspases, que desempenha um papel importante na execução da apoptose (BUDIHARDJO et al., 1999). NF-kB induz fortemente a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pelas grandes quantidades de óxido nítrico (NO) gerado no fígado (ROSA et al., 2008). O NO é uma molécula com um único elétron desemparelhado, um radical livre altamente difusível que possui atividades anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, dependendo da sua concentração e do tecido onde ele é produzido (STICHTENOTH & FROLICH, 1998). Quando o NO está presente em concentrações relativamente elevadas, os efeitos patofisiológicos e indiretos predominam devido a interações do NO com O₂ ou o radical livre superóxido (STICHTENOTH & FROLICH, 1998; DAVIS et al., 2001). Existem evidências que demonstram aumento de TNF- α no fígado, o que pode ser uma chave fundamental que conduz a morte celular por apoptose, através da ativação de caspase-8 e vias de NF-kB (INGARAMO et al., 2011).

Em nosso estudo, o transcrito *TNF- α* apresentou-se altamente induzido, o que significa que houve um aumento na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles. O valor de *fold change* para o *TNF- α* foi o maior registrado neste trabalho.

Este resultado pode indicar um perfil inflamatório nos pacientes de DM1, decorrente da alta indução da expressão do *TNF- α* .

O transcrito com modulação semelhante ao *TNF- α* no agrupamento hierárquico é *PPP5C*.

A proteína fosfatase 5 (PP5) é membro da família de proteínas serina/ treonina fosfatase, sendo que PP5 é a única entre as fosfatases desta família que contém motivos de repetição tetratricopeptídeo (TPR) que juntos, servem como um domínio de interação proteína-proteína (HUANG et al., 1998; WECHSLER et al., 2004).

PP5 está presente em todas as células eucarióticas e os seus níveis são elevados no cérebro. Estudos de localização celular revelaram a sua presença tanto no núcleo como no citoplasma. PP5 tem sido implicado na regulação da reparação de DNA, apoptose e ciclo circadiano em mamíferos. Com relação à regulação da apoptose, PP5 parece exercer controle negativo sobre a quinase reguladora de sinais apoptóticos (ASK1), que por sua vez é ativada por uma gama de fatores, tais como H_2O_2 , ligação por FAS, TNF- α , entre outros (MATSUDA et al., 2003; SHAH & CATT, 2006; KANG et al., 2011; MORITA et al., 2001).

Em nosso estudo, o transcrito *PPP5C* apresentou-se induzido, o que significa que houve um aumento na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Este resultado pode indicar a indução de processos antiapoptóticos e de reparo de danos ao DNA, além de alterações no ciclo circadiano nos pacientes de DM1.

Como afirmado anteriormente, existem evidências consideráveis de que as células T $CD4^+$ e $CD8^+$ possuem um papel importante no desenvolvimento e progressão do DM1 em humanos e modelos animais. O transcrito *TNFAIP3* (também conhecido como *A20*) pode ser considerado marcador transcricional preferencialmente expresso em células T $CD4^+$ e $CD8^+$.

A proteína codificada pelo *TNFAIP3* é necessária para a regulação negativa de respostas inflamatórias. Sabe-se que as ações do *TNFAIP3* resultam na eliminação de proteínas-chave da sinalização das vias inflamatórias, que ilustram sua importância na terminação da resposta inflamatória causada por uma variedade de estímulos. O *locus* no qual o *TNFAIP3* se encontra, 6q23 foi associado a três doenças autoimunes (artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e o próprio DM1) (LODOLCE et al., 2010; FUNG et al., 2009).

Evidências levam a crer que o *TNFAIP3* pode também ter um papel chave no sistema imune como regulador geral da imunidade e da autoimunidade, o que seria consistente com o seu papel conhecido na modulação de funções celulares, incluindo ativação celular, a sinalização de citocinas e apoptose. *TNFAIP3* é um potente supressor da via de sinalização de NF- κ B, e deficiência de *TNFAIP3* em camundongos resulta na atividade excessiva de NF- κ B e inflamação sistêmica. Os múltiplos papéis potenciais de *TNFAIP3* na regulação da inflamação não são completamente compreendidos, sendo que sua função antiapoptótica e anti-

inflamatória está relacionada à proteção de ilhotas pancreáticas. É provável que múltiplas variantes distintas de *TNFAIP3* possam modular o risco de autoimunidade em doenças diferentes e de diferentes origens ancestrais (LIUWANTARA et al., 2006; LODOLCE et al., 2010; SKAUG et al., 2011).

Em nosso estudo o transcrito *TNFAIP3* está induzido, o que significa que houve um aumento na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

O valor de *fold change* para o *TNFAIP3* foi o segundo maior registrado neste trabalho.

Um possível papel para a indução do *TNFAIP3* e de suas características anti-inflamatórias em nossos resultados seria a tentativa dos organismos desses pacientes que sofrem de DM1 a alguns anos de modular a autoimunidade e a inflamação decorrente da doença, talvez numa resposta antagônica ao *TNF- α* .

O transcrito vizinho ao *TNFAIP3* no agrupamento hierárquico é *ZDHHC17*, também conhecido como *HIP14*.

ZDHHC17 pertence a uma família de palmitoil-aciltransferases (PATs) que catalisam a palmitoilação de proteínas, uma modificação pós-traducional de lipídeos afetando o tráfego e função das proteínas. Além de atuar como uma PAT, *ZDHHC17* parece ter outros papéis, incluindo a ativação da via JNK, largamente envolvida na inflamação (GOYTAIN et al., 2008).

HIP14 codifica a proteína huntingtina, relacionada à doença de Huntington, uma doença neurodegenerativa progressiva. A função da proteína huntingtina não é clara, mas ela interage com muitas proteínas do citoesqueleto e vesícula sináptica que são essenciais para a exocitose e endocitose celular. Existem trabalhos publicados que buscam relacionar *HIP14* como sendo uma proteína candidata ao DM1, estando envolvida na regulação da apoptose em células beta pancreáticas. Os resultados indicam que a diminuição de níveis de *HIP14* em células beta conduzem a um aumento da apoptose. Experimentos de inibição de expressão de *HIP14* por *knockdown* transitório em células INS-1 inibiram o crescimento celular e apoptose induzida. Embora o nível de apoptose induzida por *knockdown* de *HIP14* tenha sido modesta (30-80% de aumento), é importante ter em mente que a morte das células beta no DM1 humano fazem parte de um processo progressivo e lento, que se estende por vários anos (MATSUDA et al., 2003; GOYTAIN et al., 2008; BERCHTOLD et al., 2011).

Em nosso estudo, o transcrito *ZDHHC17* apresentou-se induzido, o que significa que houve um aumento na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Este resultado pode indicar a contribuição deste transcrito na ativação de vias responsáveis pelo perfil inflamatório encontrado no DM1.

O transcrito *TRADD* pode ser considerado marcador transcricional preferencialmente expresso em células T CD4⁺.

TNF- α é uma citocina pleiotrópica envolvida em uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo inflamação e diferenciação celular, sobrevivência e morte. TNF- α medeia essas atividades por envolver dois receptores de superfície celular distintos: TNFR1 e TNFR2. Ativação de TNFR1 leva ao recrutamento de *TRADD* (domínio de morte intracelular que contém proteína adaptadora associada ao TNFR1). Por um lado, o recrutamento de *TRADD* pode promover a associação do complexo TNFR1 com *FADD*, que induz a ativação de caspases e de morte celular. Por outro lado, *TRADD* também pode recrutar a proteína RIP1 e o fator associado ao TNF (TRAF2), que desencadeiam a ativação de NF- κ B, que conduz a sobrevivência das células e respostas pró-inflamatórias (WERTZ & DIXL, 2010).

Existem também evidências que apontam para a participação de *TRADD* no complexo de sinalização formado por TLR4 após estimulação com LPS, que é independente das suas funções na via de TNFR1. Um artigo recente de *Michallet et al.* revelou a participação *TRADD* na via antiviral *RIG-like*. Esta descoberta sugere que *TRADD* pode ser parte importante da resposta antiviral e antibacteriana do hospedeiro (CHEN et al., 2008; KIM et al., 2011; POBEZINSKAYA et al., 2011).

Em nosso estudo o transcrito *TRADD* apresentou-se reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Estes resultados mostram que qualquer uma das funções que *TRADD* interpreta em nosso estudo, seja ela ativação de caspases, pró-inflamatória ou ligada a outro tipo de resposta, está reprimida.

Os transcritos com modulação semelhante ao *TRADD* no agrupamento hierárquico são: *LTBR* e *FKBP1A*.

LT, LIGHT e TNF são membros da superfamília TNFR de citocinas. LT e LIGHT, produzidos primariamente por linfócitos, interagem com receptor LT β R expresso pelas células estromais e epiteliais. Extensos estudos durante a última

década têm revelado o papel crítico das interações LT-LT β R para a organogênese e manutenção dos órgãos linfoides secundários e na geração de uma resposta humoral imune eficiente de vários agentes patogênicos. Estudos recentes indicam que sinalização por LT β R é necessária para a regeneração do fígado e o metabolismo hepático de lipídeos (TUMANOV et al., 2007).

Xu et al. relacionaram a adiponectina e a ativação da via de NF- κ B. A adiponectina é um hormônio proteico que modula vários processos metabólicos, incluindo a regulação da glicemia e o catabolismo de ácidos graxos. Além destas funções, exerce propriedades antidiabéticas e anti-aterogênese por meio de seus dois receptores (AdipoR1 e AdipoR2). No entanto, as vias de sinalização responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios de adiponectina são largamente desconhecidas. Além disso, a incubação de adiponectina inibe a ativação da via de NF- κ B por linfotóxina e a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais umbilicais humanas. Estes resultados indicam que AdipoR1 interage com LT β R e inibe a ativação da via de NF- κ B por LT β R (XU et al., 2011).

Além disso, estudos recentes têm demonstrado um papel importante para os nódulos linfáticos locais na patogênese de doença autoimune tecido específica. A proteína codificada por *LTBR* desempenha um papel na sinalização durante o desenvolvimento de órgãos linfoides, no metabolismo lipídico, na resposta imune e morte celular programada. Por exemplo, em um modelo animal de artrite autoimune, a inibição do desenvolvimento do linfonodo por administração intrauterina da imunoglobulina de fusão do receptor de linfotóxina (LTR-Ig) atrasou e atenuou o curso da doença (MANDIK-NAYAK et al., 2002).

No DM1, os linfonodos peripancreáticos acumulam células T diabetogênicas e podem ser o seu principal local de *priming* e ativação. Em modelos animais, camundongos sem linfonodos foram completamente protegidos do desenvolvimento do DM1 e tinham reduzido número de autoanticorpos contra células beta e números reduzidos de células T patogênicas. A proteção completa contra a doença apreciada pelos animais sem linfonodos é muito provavelmente a consequência da interrupção ou prevenção de um passo crítico no processo da doença, ou seja, a primeira imunização e expansão das células T patogénica contra células beta, um acontecimento que requer a concentração local de antígenos diabetogênicos no microambiente de um nódulo linfático. Já estudos como o de Gagnerault et al., demonstram que o DM1 foi desenvolvido após a transferência de células T nos animais sem linfonodos. Esta é uma

indicação de que o reconhecimento pelas células T de antígenos diabetogênicos pode ocorrer em pelo menos dois locais, os nódulos linfáticos de drenagem locais ou do pâncreas, sendo o primeiro local favorável para a primeira imunização, o último para o recrutamento e desenvolvimento de células T já ativadas (GAGNERAULT et al., 2002; LEVISETTI et al., 2004; LEE et al., 2006).

Em nosso estudo o transcrito *LTBR* apresentou-se sutilmente reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

A repressão da expressão de *LTBR* pode estar relacionada a uma diminuição do metabolismo hepático de lipídeos, pode afetar a manutenção dos órgãos linfoides secundários e a ativação da via de NF- κ B.

O transcrito *FKBP1A* é também conhecido como *FKBP12*, e a proteína por ele codificada é membro da família de proteínas imunofilinas, que desempenham um papel na imunorregulação e nos processos celulares básicos, envolvendo o dobramento e deslocamento de proteínas. Ela interage com várias proteínas de transdução de sinais intracelulares, incluindo o receptor do tipo I de TGF- β . Também interage com vários canais de liberação de cálcio intracelular, e coordena a formação do complexo de proteína do receptor de rianodina do músculo esquelético. Receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3Rs) e receptores rianodina (RyRs) são canais de liberação de Ca^{2+} localizados no retículo endoplasmático de células. Estes canais controlam a liberação de Ca^{2+} das reservas intracelulares para modular uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo a contração do músculo, exocitose, a divisão celular, apoptose e as vias de sinalização de células T. As funções destes canais de liberação de Ca^{2+} intracelular são moduladas por várias proteínas, incluindo a proteína FKBP12. Existem evidências crescentes de que proteínas de ligação a FKBP desempenham um papel importante na regulação da ativação de RyRs e resultante liberação de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático. (NOGUCHI et al., 1997; NAKAZAWA et al., 2005; WEN et al., 2012).

Em nosso estudo o transcrito *FKBP1A* apresentou-se reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

A repressão da expressão de *FKBP1A* pode estar relacionada a desequilíbrios na liberação de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático, afetando uma variedade de processos fisiológicos.

8.2 Gene set: Regulação da via de sinalização do receptor de TGF- β

Outro *gene set* resultante da análise de GSA foi o de *Regulação da via de sinalização do receptor de TGF- β* , que contém 14 transcritos.

Este *gene set* compreende qualquer processo que modula a frequência de taxa ou extensão da atividade de qualquer via de sinalização de receptor de TGF- β . Desde a descoberta do primeiro membro da superfamília de TGF- β no início de 1980, um número crescente de membros foram identificados e caracterizados funcionalmente em vertebrados e invertebrados. Nos mamíferos, a família TGF- β regula muitas funções celulares, incluindo crescimento celular, diferenciação, adesão, migração e apoptose. TGF- β possui um papel na modulação da inflamação, reparação de feridas, na homeostase imune e tolerância. Originalmente, o TGF- β foi descoberto como sendo um fator de crescimento que promovia o crescimento independente de ancoragem de fibroblastos. Hoje em dia, sabe-se que praticamente todas as células têm o potencial de produzir TGF- β e responder ao TGF- β , e que TGF- β pode influenciar cada sistema biológico testado *in vivo* e *in vitro*. TGF- β é também importante para mediar a imunossupressão e a manutenção da tolerância periférica exercida por Tregs (GORELIK et al., 2000; GORELIK et al., 2002; TAYLOR, 2009).

Alterações da via de sinalização de TGF- β estão envolvidos em doenças humanas, incluindo doenças cardiovasculares, reprodutivas, fibrose, câncer ou doenças relacionadas à cicatrização de feridas. O sistema de TGF- β inclui vários componentes envolvidos em diferentes níveis de sinalização padrão, fatores solúveis, receptores de membrana específicos e mediadores intracelulares. Todos os membros da família TGF- β se ligam à superfície celular aos receptores do tipo I e II (TBRI e TBRII respectivamente), os quais formam complexos heteroméricos, na presença de ligantes dimerizados. Sete TBRIIs, também denominados ALKS, assim como cinco TBRIsIIs diferentes têm sido descritos. Além disso, ligantes de TGF- β podem interagir com co-receptores endoglina e betaglicam [conhecidos como TBRIsIIs (receptores tipo III de TGF- β)] (SHI et al., 2003; BERNABEU, et al., 2009; GATZA et al., 2010).

A sinalização intracelular de TGF- β é mediada pela família de proteínas Smad. Os membros da família Smad são bem conservados e podem ser

classificados em três grupos: (i) R-Smads (Smads cooperantes), (ii) co-Smads (Smads colaborantes) e (iii) I-Smads (Smads inibitórios) (HUMINIECKI et al., 2009).

A desfosforilação de receptores e proteínas Smad contribui para a duração e intensidade da sinalização de TGF- β . Um número crescente de proteínas fosfatases foi relatado para regular a sinalização de TGF- β em ambos os níveis de receptores e Smad (LIU & FENG, 2010).

Receptores TGF- β e Smads estão sujeitos a modificações pós-traducionais, que são enzimaticamente reversíveis e regulam a sua estabilidade e disponibilidade. Outro nível de regulação é a internalização e reciclagem dos complexos ligante-receptor através de *rafts* lipídicos ou vesículas, que podem modular a sinalização, bem como degradação proteica no proteassoma (DI GUGLIELMO et al., 2003; SANTIBANEZ et al., 2008). Além da via Smad canônica, o sinal de TGF- β é determinado por uma comunicação cruzada com vias não-Smad, tais como MAPK, NF- κ B, Rho-GTPase, entre outras (MOUSTAKAS et al., 2009; ZHANG et al., 2009).

O transcrito *CDKN1C* (também conhecido como p57) pode ser considerado marcador transcricional preferencialmente expresso em células NK.

CDK4 está envolvido na regulação do peso corporal, na proliferação de células beta pancreáticas, na capacidade de resposta à insulina e na patogênese do DM1. Atividade de CDK4 é inibida por *CDKN1C*, o qual tem sua atividade regulada pela insulina. Além disso, *CDKN1C* desempenha um papel importante na proliferação de células beta e está envolvido na patogênese da síndrome de Beckwith-Wiedemann, uma desordem caracterizada por hipoglicemia hiperinsulinêmica neonatal e crescimento pré- e pós-natal. *CDKN1C* também contribui para repressão transcricional através do bloqueio da atividade de quinases dependentes de ciclina relacionadas a RNA polimerase II (KASSEM et al., 2001; NIELSEN et al., 2005; MA et al., 2010).

Em nosso estudo transcrito *CDKN1C* apresentou-se reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Este resultado pode sugerir uma predisposição ao DM1, pois a diminuição da expressão deste gene, que se acredita estar relacionado à proliferação de células beta pode contribuir na instalação da doença, juntamente com outros fatores de risco ao DM1.

O transcrito com modulação semelhante ao *CDKN1C* no agrupamento hierárquico é *IL17F*.

Interleucina 17F (*IL17F*), é membro de uma família de citocinas que estão envolvidas na regulação de respostas de células T. É uma proteína que contém 153 aminoácidos e possui 40% de homologia com *IL17*, sendo este o grau o mais elevado de homologia que *IL17* partilha com os outros membros da sua família (RAMSEY et al., 2005).

Membros da família *IL17* pertencem a uma categoria distinta de citocinas, e desempenham um papel na coordenação de inflamação do tecido local, induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e mobilização de neutrófilos. Esta citocina não possui dados referentes à seu perfil de expressão gênica em tipos celulares presentes no sistema imune no banco de dados IMMGEN (KAWAGUCHI et al., 2006).

Embora células T CD4⁺ sejam as principais fontes de *IL17*, algumas populações de células inatas pode também produzir citocinas do perfil Th17 quando estimuladas com *IL23*. Células iNKT produzem *IL17* e *IL22* em resposta a bactérias mortas pelo calor, além de populações de células T não-CD4⁺, tais como células T $\gamma\delta$ e células NK, também são capazes de produzir citocinas do perfil Th17 (McALEER et al., 2011).

Estudos extensivos com modelos animais e humanos de doenças autoimunes, concluíram que o perfil Th17 está implicado na imunopatogênese da psoríase, artrite reumatoide e esclerose múltipla (KOBAYASHI et al., 1999; VAN BEELEN et al., 2007; TZARTOS et al., 2008).

Mais recentemente, o perfil Th17 foi demonstrado no desenvolvimento de diabetes autoimune em modelos animais. Em camundongos NOD, um modelo de diabetes autoimune espontânea, a inibição de células Th17 foi usada para regular a diabetes autoimune (HONKANEN et al., 2011).

Nos seres humanos, o papel do perfil Th17 no DM1 não é conhecido, ao passo que a indução da resposta a *IL-17* tem sido associado a outras doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla, artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal. Um papel para imunidade Th17 no DM1 humano foi indiretamente sugerido por um recente relatório em que a *IL1* e *IL6* provenientes de monócitos de pacientes com DM1 induziu a produção de *IL17* por células T alogênicas de memória *in vitro*. No entanto, o aumento da secreção de *IL17* após ativação das

células T foi demonstrado apenas em células T do sangue periférico de pacientes com DM1 de longa duração, mas não em pacientes com DM1 de início recente (BRADSHAW et al., 2009).

Outros trabalhos demonstraram altos níveis de citocinas do perfil Th17 em crianças recém-diagnosticadas com DM1, revelando um perfil inflamatório Th17 no início do DM1 (FERRARO et al., 2011; HONKANEN et al., 2012).

Em nosso estudo o transcrito *IL17F* apresentou-se sutilmente reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Existe a possibilidade de que nossos pacientes possuíram um perfil de citocinas inflamatórias Th17 na instalação da autoimunidade no DM1, mas que no período da coleta, anos após a instalação da doença, esse perfil não seja mais tão exacerbado e que outras citocinas inflamatórias estejam agindo no organismo, como o TNF.

8.3 Gene set: *Regulação da cascata de JAK-STAT*

Outro gene set resultante da análise de GSA foi *Regulação da cascata de JAK-STAT*.

Este processo é definido como qualquer processo no qual as proteínas STAT (transdutores de sinal e ativadores de transcrição) e JAK (Janus quinase ativada) transmitem um sinal para provocar uma mudança na atividade ou estado de uma célula. A cascata JAK-STAT emana de receptores de citocinas na membrana plasmática, seguindo com a ativação de proteínas STAT por membros da família JAK de tirosina quinases, e prossegue através de dimerização e subsequente translocação nuclear de proteínas STAT, e termina com a regulação da expressão do gene alvo por proteínas STAT. A JAK-STAT é uma de muitas cascatas pleiotrópicas utilizadas para transduzir uma multiplicidade de sinais para o desenvolvimento e homeostase em animais, de moscas a humanos. Nos mamíferos, a via JAK-STAT é o principal mecanismo de sinalização para uma grande variedade de citocinas e fatores de crescimento, estimulando a proliferação celular, diferenciação, migração celular e apoptose. Esses eventos celulares são essenciais

para hematopoese, desenvolvimento imunológico, desenvolvimento da glândula mamária e lactação, adipogênese e outros processos (AARONSON & HORVATH, 2002; KISSELEVA et al., 2002, O'SHEA et al., 2002; HEINRICH et al., 2003; RAWLINGS et al., 2004).

Diferentes JAKs e STATs são recrutados com base em sua especificidade de tecido e nos receptores envolvidos na sinalização (SCHINDLER & PLUMLEE, 2008). Embora a via JAK-STAT canônica seja simples e direta, os componentes da via regulam ou são regulados por membros de outras vias de sinalização. Além disso, as atividades não canônicas de JAK e STAT influenciam o estado global de transcrição através da modificação da estrutura da cromatina (LI et al., 2008; DAWSON et al., 2009; HARRISON, 2012).

O genoma humano codifica quatro JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2) e sete STATs (STAT 1, 2, 3, 4, 5A, 5B e 6). O número de ligantes e receptores que podem ativar a via JAK-STAT é muito maior. Todos os interferons, a maioria das interleucinas, muitos fatores de crescimento e alguns hormônios ativam fatores de transcrição STAT. STATs não são apenas ativados por receptores de citocinas que se associam com JAKs, mas também por receptores tirosina-quinase e receptores acoplados a proteína-G. Dependendo do receptor, a ativação de STAT por receptores que não sejam de citocinas podem ser JAK-dependente ou independente de JAK (LEVY & DARNELL, 2002). Receptores de citocinas que estão associadas com JAKs são os ativadores mais proeminentes de STATs (MOHR et al., 2012).

O transcrito *IL12A* presente neste *gene set* pode ser considerado marcador transcricional preferencialmente expresso em células B.

A IL12 é produzida por monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, e células B; e atua em células T e células NK, apresentando uma ampla gama de atividades biológicas. É uma citocina heterodimérica codificada por dois genes separados, *IL12A* (p35) e de *IL12B* (p40) (VASCONCELLOS et al., 2012). As respostas dos linfócitos a esta citocina são mediados pela proteína ativadora de transcrição STAT4. A enzima óxido nítrico sintase 2A (NOS2A/NOS2) é necessária para o processo de sinalização desta citocina na imunidade inata (WATFORD et al., 2003).

Esta citocina é necessária para a indução de células T independente de IFN- γ , e é importante para a diferenciação de células para o perfil Th1 e Th2, o que sugere que a IL12 pode desempenhar um papel crítico no desenvolvimento de

células Th1 efetoras diabetogênicas, específicas para antígenos de ilhotas pancreáticas. A IL12 desempenha um papel importante não só no desenvolvimento de células Th1 efetoras, mas também na ativação de células T efetoras na fase efetora do diabetes autoimune (FUJIIHARA et al., 2000).

A subunidade maior (p40) é homóloga ao receptor solúvel de IL6, ao passo que a menor subunidade (p35) é homóloga a IL6. IL12 induz a proliferação, citotoxicidade e produção de citocinas pelas células NK (BORISH & STEINKE, 2003).

Estudos mostram que a produção *in vitro* de IL12 por células do sangue periférico em sujeitos com alto risco de desenvolver DM1 estava aumentada (SZELACHOWSKA et al., 1997).

Além disso, a administração de IL12 para camundongos pré-diabéticos NOD fêmea foi recentemente relatada como aceleradora do início de diabetes, e isto foi associado com maior produção de IFN- γ e diminuição produção de IL4 por linfócitos infiltrantes de ilhotas, sendo que o IFN- γ está fortemente implicado como um mediador da destruição das células beta no DM1 (RABINOVICH et al., 1996).

Em nosso estudo o transcrito *IL12A* apresentou-se induzido, o que significa que houve um aumento na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Existe a possibilidade de que a indução de *IL12A* esteja relacionada com a manutenção de uma resposta do perfil Th1 em nossos pacientes, condizente com dados da literatura que apontam para o DM1 como uma doença mediada por células pertencentes ao perfil Th1 (LEHUEN et al., 2010).

O transcrito com modulação semelhante ao *IL12A* no agrupamento hierárquico é *IL31RA*, também conhecida como *GLMR*.

IL31 é uma citocina recentemente descoberta, que pertence à família das citocinas gp130/IL-6 que inclui IL6, IL11, IL27, o fator inibidor de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), fator neurotrófico ciliar (CNTF), entre outros (DILLON et al., 2004; ZHANG et al., 2008).

A produção de IL31 ocorre principalmente por células T auxiliares CD4⁺, mas seu receptor possui um amplo espectro de expressão nas células imunes e não imunes, sugerindo que esta nova citocina pode ter múltiplas e pleiotrópicas funções fisiológicas (DIVEU et al., 2003; DILLON et al., 2004; ZHANG et al., 2008).

IL31 tem sido estabelecida como uma citocina derivada do padrão Th2, apesar de células T do padrão Th1 também exibirem produção de quantidades limitadas de mRNA de IL31 (DILLON et al., 2004).

Experimentos de *Northern blot* revelaram que expressão constitutiva de *IL31RA* em humanos e camundongos pode ser detectada no cérebro, pele, pulmão, traqueia, músculo esquelético, testículos, ovário, próstata, medula óssea, placenta, baço, timo e leucócitos sanguíneos (DILLON et al., 2004).

Expressão aumentada de *IL-31RA* foi descrita em doenças inflamatórias de pele e estudos *in vitro* analisaram que os efeitos da citocina IL-31 em queratinócitos epidérmicos devem considerar a variação de expressão da *IL-31RA*, o que depende do estado de diferenciação celular e a influência de citocinas pró-inflamatórias (HEISE et al., 2009).

A ligação do ligante ao receptor de IL31 leva à ativação de tirosina-quinases citoplasmáticas da família Janus quinase (JAK), que conduz à fosforilação de proteínas-alvo citoplasmáticas STAT. Fosforilação de STATs induz sua dimerização e translocação para o núcleo, resultando em ativação da transcrição de genes específicos (GHILARDI et al., 2002).

Em nosso estudo o transcrito *IL31RA* apresentou-se sutilmente induzido, o que significa que houve um aumento na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

A ligação de *IL31RA* com o DM1 ainda é desconhecida, mas talvez possua alguma participação no perfil inflamatório da doença, devido à sua relação com as citocinas da família IL6, que já foram envolvidas com o DM1 e suas possíveis complicações (NEURATH et al., 2011; SHELBOYA et al., 2012).

8.4 Gene set: Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas

O último *gene set* resultante da análise de GSA a ser discutido no trabalho será o de *Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas*.

Citocinas e quimiocinas são proteínas redundantes secretadas com as funções de diferenciação, crescimento e de ativação que regulam e determinam a

natureza das respostas imunes, o controle do tráfego celular imunológico e o arranjo dos órgãos do sistema imunológico.

Quais citocinas são produzidas em resposta a um insulto imune determinam inicialmente se uma resposta imune é desenvolvida e, subsequentemente, se essa resposta é citotóxica, humoral, mediada por células, ou alérgica. Uma cascata de respostas pode ser vista em resposta a citocinas, e muitas vezes são necessárias várias citocinas em sinergia para expressar uma função ótima. Uma variável adicional da função de citocinas é a de que cada citocina pode ter uma função completamente diferente, dependendo da fonte celular, do alvo, e o mais importante, da fase específica da resposta imune durante a qual é apresentada. Numerosas citocinas apresentam potencial pró-inflamatório e anti-inflamatório; a atividade observada depende das células imunes envolvidas e seu estado de capacidade de resposta à citocina. As citocinas estão envolvidas em praticamente todos os aspectos da imunidade e inflamação, incluindo a imunidade inata, a apresentação de antígeno, diferenciação da medula óssea, recrutamento celular e ativação, e expressão de moléculas de adesão (MYIAJIMA et al., 1992; BORISH & STEINKE, 2003).

As quimiocinas são um grupo de pequenas moléculas (8-12 kD) capazes de induzir quimiotaxia de uma grande variedade de células incluindo neutrófilos, monócitos, linfócitos, eosinófilos, fibroblastos e queratinócitos. Estas moléculas regulam a atividade através de interações com os membros da superfamília de receptores transmembrana acoplados à proteína G. Embora a quimiotaxia permaneça como a marca característica das quimiocinas, o seu papel fisiológico é mais complexo do que originalmente descrito, e novas funções continuam a ser identificadas. Originalmente, as quimiocinas foram descritas como inflamatórias, sendo produzidas no local da infecção, ou em resposta a um estímulo pró-inflamatório. As quimiocinas inflamatórias recrutam e ativam os leucócitos para montar uma resposta imune e iniciar a cura de feridas. Outras quimiocinas têm agora sido relacionadas a uma função homeostática ou de *housekeeping*. Estas funções estão envolvidas em respostas imunes adaptativas, incluindo o tráfego dos linfócitos, a hematopoese, a amostragem do antígeno no tecido linfoide secundário, e de vigilância imunológica. Quimiocinas homeostáticas tendem a ser expressas em tecidos ou órgãos específicos, ao passo que as quimiocinas inflamatórias podem ser produzidas por vários tipos celulares em vários locais (ZLOTNIK et al., 2000; BORISH & STEINKE, 2003; MOSER 2001; THELEN et al., 2001).

O transcrito *IL2RB* presente neste *gene set* pode ser considerado marcador transcricional preferencialmente expresso em células NK.

O receptor de IL2, o qual está envolvido nas respostas mediadas por células T, está presente em três formas no que diz respeito à capacidade de se ligar a IL2. A forma de baixa afinidade é um monômero da subunidade alfa e não está envolvida na transdução de sinal. A forma de afinidade intermediária é constituída por um heterodímero de subunidades alfa / beta, enquanto a forma de afinidade alta consiste em subunidades alfa/ beta/ gama. A proteína codificada por este gene representa a subunidade beta e é uma proteína de membrana do tipo I. Desde a identificação e caracterização inicial da IL2, a sua função precisa na fisiologia do sistema imune permanece enigmática. *In vitro*, a IL-2 estimula o crescimento e expansão da população de células T de forma potente. Em contraste, *in vivo*, a função dominante de IL2 parece ser a manutenção da homeostase do sistema imune e da tolerância ao próprio. Esta última função é enfatizada pela descoberta inesperada de que camundongos deficientes em IL2 ou de componentes do receptor da IL2, IL-2RA (CD25), ou IL-2RB (CD122), sucumbem a uma agressiva, síndrome linfoproliferativa autoimune (SUZUKI et al., 1995). A conclusão aparentemente paradoxal retirada dessas observações é de que a IL2 tem duas funções opostas na biologia da célula T: potenciar a proliferação de células T e de terminação de respostas de células T. Além disso, IL2 tem sido associada com a biologia das células T reguladoras (Treg), que são mediadores críticos de tolerância imune. A maioria destas células reguladoras expressa constitutivamente as cadeias de alta afinidade de IL2R (composto da IL2RA, IL2RB e IL2RG). Conceitualmente, uma função crítica para a IL2 na biologia de células Treg oferece uma solução atraente para o paradoxo acima mencionado: a sinalização de IL2 pode potenciar a sobrevivência e proliferação das células Treg e, assim, manter a tolerância a si mesmo. No entanto, a função específica da IL2 na biologia das células Treg não é clara (FONTENOT et al., 2005; PLAGNOL et al., 2011).

Polimorfismos nos genes que codificam as duas subunidades diferentes do receptor, *IL2RA* e *IL2RB*, também têm sido associadas com uma maior predisposição ao DM1, artrite reumatoide ou esclerose múltipla, sugerindo um mecanismo comum em sua patogênese (HAFLER et al., 2007; LOWE et al., 2007; VAN HEEL et al., 2007; WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM, 2007; MÁRQUEZ et al., 2009; CAVANILLAS et al., 2010).

Em nosso estudo o transcrito *IL2RB* apresentou-se reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

Existe a possibilidade de que a repressão nos níveis de *IL2RB* esteja participando em mecanismos autoimunes relacionados ao DM1, de forma a prejudicar a ação das células Treg. Fontenot *et al.*, mostrou que a sinalização por IL2 é necessária para a manutenção da expressão de genes envolvidos na regulação do crescimento celular e metabolismo, levando a crer que esta sinalização é criticamente necessária para a manutenção da homeostase e bom funcionamento de Tregs *in vivo* (FONTENOT *et al.*, 2005).

O transcrito com modulação semelhante ao *IL2RB* é *SIGIRR* (também conhecido como *TIR8*).

SIGIRR representa um subgrupo único da superfamília Toll-IL-1R, com um único domínio de imunoglobulina extracelular e um domínio TIR (Toll/IL-1R) intracelular (WALD *et al.*, 2003; GARLANDA *et al.*, 2004; XIAO *et al.*, 2007).

SIGIRR é amplamente expresso em tecidos, com níveis elevados de expressão no trato digestivo, rins, fígado, pulmão e nos órgãos linfoides. *SIGIRR* é expresso pelas células NK, células B, monócitos e células dendríticas mielóides imaturas, com expressão reduzida após maturação (POLENTARUTTI *et al.*, 2003; LECH *et al.*, 2007; XIAO *et al.*, 2007).

Existem muitas evidências indicando que *SIGIRR* modula as respostas inflamatórias numa variedade de tecidos e existe um grande interesse em estudar o envolvimento de *SIGIRR* em doenças autoimunes, resultante da identificação recente de sinalização por TLR em DC e células B, como um mecanismo patogênico do lúpus em modelos animais. Lúpus resulta de uma combinação de anomalias genéticas que afetam o tratamento de autoantígenos nucleares, a persistência de linfócitos autoreativos e a produção de fatores imunoregulatórios. O mecanismo patogênico subjacente à susceptibilidade de camundongos *Tir8-deficientlpr/lpr* à autoimunidade baseia-se na ativação de DC para autoantígenos complexados de lúpus, a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL6 e IL12p40 e os fatores de sobrevivência de células B Baff/BLyS e Bcl-2. Além disso, descobriu-se que *SIGIRR* controla a proliferação de células B com a exposição à imunocomplexos de RNA e DNA, bem como a outros agonistas de TLR, e na produção de autoanticorpos do lúpus. Neste processo complexo, *SIGIRR* parece ser um novo gene de

susceptibilidade para o lúpus, envolvido na supressão da ativação de células apresentadoras de antígeno que lidam com autoantígenos (RAHMAN et al., 2008).

Além do lúpus em modelos animais, no modelo de colite induzida por dextrano sulfato de sódio, camundongos *SIGIRR*^{-/-} mostraram um aumento de inflamação e maior susceptibilidade ao desafio de endotoxina. Evidência crescente implica sinalização por TLR e de IL-1R na patologia da artrite reumatoide (DREXLER et al., 2010).

Em nosso estudo o transcrito *SIGIRR* apresentou-se reprimido, o que significa que houve uma diminuição na sua expressão nos pacientes, quando comparado com a expressão nos controles.

O resultado obtido com relação à expressão de *SIGIRR* em PBMCs em nosso trabalho é semelhante aos resultados obtidos por *Batliwalla et al.*, também em humanos, onde expressão reduzida de *SIGIRR* foi observado no sangue periférico de pacientes com artrite psoriática, juntamente com outros genes envolvidos na regulação negativa ou supressão de respostas imunes (BATLIWALLA et al., 2005). Assim como CTLA-4 e PTPN22 esse gene poderia ser um marcador de predisposição às doenças autoimunes.

A metodologia de microarrays possibilitou a observação dos perfis de expressão de inúmeros genes e *gene sets*, alguns já previamente relacionados à doença e outros nunca discutidos. Além disso, foi possível evidenciar genes relacionados a possíveis complicações decorrentes do DM1

8.5 Confirmação dos dados de *microarrays* por PCR em tempo real

Três genes presentes em *gene sets* discutidos no trabalho foram escolhidos para confirmação dos dados de *microarrays* por PCR em tempo real: *IL2RB* (presente no *gene set Via de sinalização mediada por citocinas e quimiocinas*), *TNF* (presente no *gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB*) e *NOD2* (presente no *gene set Cascata de I-kappaB kinase/NF-kappaB*) apresentaram modulação da expressão gênica semelhante e também um alto nível de correlação nos experimentos de *microarrays* e PCR em tempo real, sendo os dados provenientes dos *microarrays* considerados confirmados.

CONCLUSÕES

9 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível constatar a diferença entre o perfil transcricional de amostras de controles e de pacientes com DM1 através de agrupamento hierárquico de todos os dados de *microarray*.

Foi observado também o agrupamento hierárquico de amostras de pacientes e controles saudáveis baseado nos valores obtidos para o cálculo de coeficientes de correlação de Pearson. Tal cálculo permitiu a obtenção dos valores de correlação de todas as possíveis combinações entre as amostras e a observação dos níveis de correlação entre os perfis de expressão de pacientes e controles saudáveis.

Além disso, a identificação de *gene sets* estatisticamente significantes a partir da análise não supervisionada de GSA revelou a participação de diversos processos e vias biológicas envolvidas no DM1. Foi possível também identificar possíveis marcadores transcricionais com expressão preferencial em tipos celulares do sistema imune. Com base na semelhança de perfil transcricional com os marcadores, foi possível apontarmos transcritos suplementares que provavelmente participam numa mesma via e/ou processo biológico e podem estar relacionados à possíveis complicações futuras decorrentes do DM1.

Os resultados obtidos puderam ser confirmados por PCR em tempo real e contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no DM1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONSON, D. S.; HORVATH, C. M. A road map for those who don't know JAK-STAT. **Science (New York, N.Y.)**, v. 296, n. 5573, p. 1653–1655, 2002.

AITTOKALLIO, T.; KURKI, M.; NEVALAINEN, O. et al. Computational strategies for analyzing data in gene expression microarray experiments. **Journal of bioinformatics and computational biology**, v. 1, n. 3, p. 541–586, 2003.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

ALY, T. A.; IDE, A.; JAHROMI, M. M. et al. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 38, p. 14074–14079, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, n. Supplement_1, p. S64–S71, 2011. Acesso em: 20/06/2012.

ANDERSON, M. S.; SU, M. A. Aire and T cell development. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 2, p. 198–206, 2011.

ANDERSON, M. S.; VENANZI, E. S.; KLEIN, L. et al. Projection of an immunological self-shadow within the thymus by the aire protein. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5597, p. 1395–1401, 2002.

ANJOS, S. M.; TESSIER, M.-C.; POLYCHRONAKOS, CONSTANTIN. Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 12, p. 6257–6265, 2004.

ATKINSON, M A; BOWMAN, M. A.; KAO, K. J. et al. Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes. **The New England journal of medicine**, v. 329, n. 25, p. 1853–1858, 1993.

BACH, F. H. Heme oxygenase-1 as a protective gene. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 114 Suppl 4, p. 1–3, 2002.

BACH, J.-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. **The New England journal of medicine**, v. 347, n. 12, p. 911–920, 2002.

BADAMI, E.; SORINI, C.; COCCIA, M. et al. Defective differentiation of regulatory FoxP3⁺ T cells by small-intestinal dendritic cells in patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 8, p. 2120–2124, 2011.

BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Annual review of immunology**, v. 12, p. 141–179, 1994.

BAKER, P. R., 2nd; STECK, ANDREA K. The past, present, and future of genetic associations in type 1 diabetes. **Current diabetes reports**, v. 11, n. 5, p. 445–453, 2011.

BALASA, B.; KRAHL, T.; PATSTONE, G. et al. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 159, n. 9, p. 4620–4627, 1997a.

BARRETT, J. C.; CLAYTON, D. G.; CONCANNON, PATRICK; 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, 2009.

BATLIWALLA, F. M.; LI, W.; RITCHLIN, C. T. et al. Microarray analyses of peripheral blood cells identifies unique gene expression signature in psoriatic arthritis. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 11, n. 1-12, p. 21–29, 2005.

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, 1984.

BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B.; TEYTON, LUC. The biology of NKT cells. **Annual review of immunology**, v. 25, p. 297–336, 2007.

BENNETT, S. T.; LUCASSEN, A. M.; GOUGH, S C; et al. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. **Nature genetics**, v. 9, n. 3, p. 284–292, 1995.

BENOIST, C.; LANIER, L.; MERAD, M.; MATHIS, D. Consortium biology in immunology: the perspective from the Immunological Genome Project. **Nature reviews. Immunology**, v. 12, n. 10, p. 734–740, 2012.

BERCHTOLD, L. A.; STØRLING, Z. M.; ORTIS, F. et al. Huntingtin-interacting protein 14 is a type 1 diabetes candidate protein regulating insulin secretion and beta-cell apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 37, p. E681–688, 2011.

BERNABEU, C.; LOPEZ-NOVOA, J. M.; QUINTANILLA, M. The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1792, n. 10, p. 954–973, 2009.

BILD, A.; FEBBO, P. G. Application of a priori established gene sets to discover biologically important differential expression in microarray data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15278–15279, 2005.

BINGLEY, P. J.; CHRISTIE, M. R.; BONIFACIO, E. et al. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. **Diabetes**, v. 43, n. 11, p. 1304–1310, 1994.

BLACKLEY CH. Experimental Researches on the Causes and Nature of Catarrhus Aestivus (Hay-fever and Hay-asthma). London: Baillière Tindall and Cox, 1873

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1293–1300, 2010.

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, 2003.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S460–475, 2003.

BOTTINI, NUNZIO; 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, 2004.

BOTTINI, NUNZIO; VANG, T.; CUCCA, F.; MUSTELIN, T. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. **Seminars in immunology**, v. 18, n. 4, p. 207–213, 2006.

BOUQBIS, L.; AKHAYAT, O.; GARCHON, H.-J.; CALAFELL, F.; IZAABEL, H. TNFA-TNFB haplotypes modify susceptibility to type I diabetes mellitus independently of HLA class II in a Moroccan population. **Tissue antigens**, v. 61, n. 1, p. 72–79, 2003.

BÖYUM, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum**, v. 97, p. 7, 1968.

BRADSHAW, E. M.; RADDASSI, K.; ELYAMAN, W. et al. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 183, n. 7, p. 4432–4439, 2009.

BRAUNER, H.; ELEMANS, M.; LEMOS, S. et al. Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 184, n. 5, p. 2272–2280, 2010.

BREITLING, R. Biological microarray interpretation: the rules of engagement. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1759, n. 7, p. 319–327, 2006.

BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Nature genetics**, v. 21, n. 1 Suppl, p. 33–37, 1999.

BUDIHARDJO, I.; OLIVER, H.; LUTTER, M.; LUO, X.; WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 15, p. 269–290, 1999.

CANTOR, J.; HASKINS, KATHRYN. Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: evidence for involvement of CCR8 and CCL1. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 179, n. 9, p. 5760–5767, 2007.

CAVANILLAS, M. L.; ALCINA, A.; NÚÑEZ, C. et al. Polymorphisms in the IL2, IL2RA and IL2RB genes in multiple sclerosis risk. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 18, n. 7, p. 794–799, 2010.

CDC - 2011 National Diabetes Fact Sheet - Publications - Diabetes DDT. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/factsheet11.htm>>. Acesso em: 25/06/2012.

CHEN, N.-J.; CHIO, I. I. C.; LIN, W.-J. et al. Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 34, p. 12429–12434, 2008.

CHENTOUFI, A. A.; POLYCHRONAKOS, CONSTANTIN. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1383–1390, 2002.

COMMITTEE, T. I. E. International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 7, p. 1327–1334, 2009. Acesso em: 15/08/2012.

Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. **Nature**, v. 401, n. 6756, p. 921–923, 1999.

CONCANNON, PATRICK; CHEN, W.-M.; JULIER, CÉCILE; et al. Genome-wide scan for linkage to type 1 diabetes in 2,496 multiplex families from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 1018–1022, 2009.

COOKE, D.; HUREL, S. J.; CASBARD, A. et al. Randomized controlled trial to assess the impact of continuous glucose monitoring on HbA(1c) in insulin-treated diabetes (MITRE Study). **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 26, n. 5, p. 540–547, 2009.

CORPER, A L; STRATMANN, T.; APOSTOLOPOULOS, V. et al. A structural framework for deciphering the link between I-Ag7 and autoimmune diabetes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5465, p. 505–511, 2000.

COURILLEAU, D.; CHASTRE, E.; SABBAH, M; et al. B-ind1, a novel mediator of Rac1 signaling cloned from sodium butyrate-treated fibroblasts. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 23, p. 17344–17348, 2000.

CRISWELL, L. A.; PFEIFFER, K. A.; LUM, R. F. et al. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. **American journal of human genetics**, v. 76, n. 4, p. 561–571, 2005.

DAHLQUIST, G.; SAVILAHTI, E.; LANDIN-OLSSON, M. An increased level of antibodies to beta-lactoglobulin is a risk determinant for early-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus independent of islet cell antibodies and early introduction of cow's milk. **Diabetologia**, v. 35, n. 10, p. 980–984, 1992.

DANEMAN, D.; FISHMAN, L.; CLARSON, C.; MARTIN, J. M. Dietary triggers of insulin-dependent diabetes in the BB rat. **Diabetes research (Edinburgh, Scotland)**, v. 5, n. 2, p. 93–97, 1987.

DAVIS, L. S.; LIPSKY, P. E.; BOTTOMLY, K. Measurement of human and murine interleukin 2 and interleukin 4. **Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]**, v. Chapter 6, p. Unit 6.3, 2001.

DENG, Y.; TSAO, B. P. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 6, n. 12, p. 683–692, 2010.

DERBINSKI, J.; KYEWSKI, B. How thymic antigen presenting cells sample the body's self-antigens. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 5, p. 592–600, 2010.

DI GUGLIELMO, G. M.; LE ROY, C.; GOODFELLOW, A. F.; WRANA, J. L. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. **Nature cell biology**, v. 5, n. 5, p. 410–421, 2003.

DILLON, S. R.; SPRECHER, C.; HAMMOND, A. et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. **Nature immunology**, v. 5, n. 7, p. 752–760, 2004.

DIVEU, C.; LELIÈVRE, E.; PERRET, D. et al. GPL, a novel cytokine receptor related to GP130 and leukemia inhibitory factor receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 50, p. 49850–49859, 2003.

DOTTA, F.; CENSINI, S.; VAN HALTEREN, A. G. S. et al. Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 12, p. 5115–5120, 2007.

DOUGLAS, J. L.; GUSTIN, J. K.; VISWANATHAN, K. et al. The great escape: viral strategies to counter BST-2/tetherin. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 5, p. e1000913, 2010.

DREXLER, S. K.; KONG, P.; INGLIS, J. et al. SIGIRR/TIR-8 is an inhibitor of Toll-like receptor signaling in primary human cells and regulates inflammation in models of rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 62, n. 8, p. 2249–2261, 2010.

DURIE, F. H.; FAVA, R. A.; FOY, T. M. et al. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. **Science (New York, N.Y.)**, v. 261, n. 5126, p. 1328–1330, 1993.

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, 1998.

EIZIRIK, DÉCIO L.; COLLI, M. L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 5, n. 4, p. 219–226, 2009.

EL-ASRAR, M. A.; ADLY, A. A.; ISMAIL, E. A. Soluble CD40L in children and adolescents with type 1 diabetes: relation to microvascular complications and glycemic control. **Pediatric diabetes**, v. 13, n. 8, p. 616–624, 2012.

ERLICH, H.; VALDES, A. M.; NOBLE, J. et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 1084–1092, 2008.

ESPOSITO, K.; NAPPO, F.; MARFELLA, R. et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. **Circulation**, v. 106, n. 16, p. 2067–2072, 2002.

FARQUHAR, C. A.; PATERSON, A. M.; COBBOLD, S. P. et al. Tolerogenicity is not an absolute property of a dendritic cell. **European journal of immunology**, v. 40, n. 6, p. 1728–1737, 2010.

FERRARO, A.; SOCCI, C.; STABILINI, A. et al. Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 11, p. 2903–2913, 2011.

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, 1993.

FONTENOT, J. D.; RASMUSSEN, J. P.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. **Nature immunology**, v. 6, n. 11, p. 1142–1151, 2005.

FOSS, M. C.; FOSS, N. T.; PACCOLA, G. M.; SILVA, C. L. Serum levels of tumor necrosis factor in insulin-dependent diabetic patients. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 25, n. 3, p. 239–242, 1992.

FOSS, N. T.; FOSS-FREITAS, M C; FERREIRA, M. A. N. et al. Impaired cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in type 1 diabetic patients. **Diabetes & metabolism**, v. 33, n. 6, p. 439–443, 2007.

FRANCIOSI, M.; LUCISANO, G.; AMORETTI, R. et al. Costs of treatment and complications of adult type 1 diabetes. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD**, 2012.

FUJIIHARA, K.; NAGATA, M; MORIYAMA, H. et al. Suppression and acceleration of autoimmune diabetes by neutralization of endogenous interleukin-12 in NOD mice. **Diabetes**, v. 49, n. 12, p. 1998–2006, 2000.

FUNG, E. Y. M. G.; SMYTH, D J; HOWSON, J M M; et al. Analysis of 17 autoimmune disease-associated variants in type 1 diabetes identifies 6q23/TNFAIP3 as a susceptibility locus. **Genes and immunity**, v. 10, n. 2, p. 188–191, 2009.

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 abr. 2012. , [S.d.]

GAGNERAULT, M.-C.; LUAN, J. J.; LOTTON, C.; LEPAULT, F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 196, n. 3, p. 369–377, 2002.

GALÁN, M.; KASSAN, M.; CHOI, S.-K. et al. A novel role for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and its downstream endoplasmic reticulum stress in cardiac damage and microvascular dysfunction in type 1 diabetes mellitus. **Hypertension**, v. 60, n. 1, p. 71–80, 2012.

GAN, M. J.; ALBANESE-O'NEILL, A.; HALLER, M. J. Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. **Current problems in pediatric and adolescent health care**, v. 42, n. 10, p. 269–291, 2012.

GASCH, A. P.; SPELLMAN, P. T.; KAO, C. M. et al. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. **Molecular biology of the cell**, v. 11, n. 12, p. 4241–4257, 2000.

GATZA, C. E.; OH, S. Y.; BLOBE, G. C. Roles for the type III TGF-beta receptor in human cancer. **Cellular signalling**, v. 22, n. 8, p. 1163–1174, 2010.

Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**, v. 447, n. 7145, p. 661–678, 2007.

GILLESPIE, K. M.; GALE, E. A. M.; BINGLEY, POLLY J. High familial risk and genetic susceptibility in early onset childhood diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 1, p. 210–214, 2002.

GORELIK, L; FLAVELL, R A. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 171–181, 2000.

GORELIK, LEONID; FLAVELL, RICHARD A. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 1, p. 46–53, 2002.

GOTO, T.; KENNEL, S. J.; ABE, M. et al. A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. **Blood**, v. 84, n. 6, p. 1922–1930, 1994.

GOYTAIN, A.; HINES, R. M.; QUAMME, G. A. Huntingtin-interacting proteins, HIP14 and HIP14L, mediate dual functions, palmitoyl acyltransferase and Mg²⁺ transport. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 48, p. 33365–33374, 2008.

HAFNER, D. A.; COMPSTON, A.; SAWCER, S. et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. **The New England journal of medicine**, v. 357, n. 9, p. 851–862, 2007.

HAKONARSON, H.; GRANT, S. F. A.; BRADFIELD, J. P. et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. **Nature**, v. 448, n. 7153, p. 591–594, 2007.

HAKONARSON, H.; QU, H.-Q.; BRADFIELD, J. P. et al. A novel susceptibility locus for type 1 diabetes on Chr12q13 identified by a genome-wide association study. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 1143–1146, 2008.

HALLER, M. J.; ATKINSON, MARK A.; SCHATZ, D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. **Pediatric clinics of North America**, v. 52, n. 6, p. 1553–1578, 2005.

HAMAGUCHI, K.; KIMURA, A.; SEKI, N. et al. Analysis of tumor necrosis factor- α promoter polymorphism in type 1 diabetes: HLA-B and -DRB1 alleles are primarily associated with the disease in Japanese. **Tissue antigens**, v. 55, n. 1, p. 10–16, 2000.

HANAHAN, D. Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. **Current opinion in immunology**, v. 10, n. 6, p. 656–662, 1998.

HARRISON, D. A. The Jak/STAT pathway. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 3, 2012.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & development**, v. 26, n. 3, p. 203–234, 2012.

HEINRICH, P. C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S. et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **The Biochemical journal**, v. 374, n. Pt 1, p. 1–20, 2003.

HEISE, R.; NEIS, M. M.; MARQUARDT, Y. et al. IL-31 receptor alpha expression in epidermal keratinocytes is modulated by cell differentiation and interferon gamma. **The Journal of investigative dermatology**, v. 129, n. 1, p. 240–243, 2009.

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, 2008.

HIRSCHHORN, J. N.; DALY, M. J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. **Nature reviews. Genetics**, v. 6, n. 2, p. 95–108, 2005.

HOGQUIST, K. A.; BALDWIN, T. A.; JAMESON, S. C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 10, p. 772–782, 2005.

HONEYMAN, M. C.; STONE, N. L.; FALK, B. A.; NEPOM, G.; HARRISON, L. C. Evidence for molecular mimicry between human T cell epitopes in rotavirus and pancreatic islet autoantigens. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 184, n. 4, p. 2204–2210, 2010.

HONKANEN, J.; NIEMINEN, J. K.; GAO, R. et al. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 185, n. 3, p. 1959–1967, 2010.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V. et al. Gene map of the extended human MHC. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 12, p. 889–899, 2004.

HORWITZ, M. S.; BRADLEY, L. M.; HARBERTSON, J. et al. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. **Nature medicine**, v. 4, n. 7, p. 781–785, 1998.

HU, C.-M.; LIN, H.-H.; CHIANG, M.-T.; CHANG, P.-F.; CHAU, L.-Y. Systemic expression of heme oxygenase-1 ameliorates type 1 diabetes in NOD mice. **Diabetes**, v. 56, n. 5, p. 1240–1247, 2007.

HU, CHANG-YUN; RODRIGUEZ-PINTO, D.; DU, W. et al. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 12, p. 3857–3867, 2007.

HUANG, X.; HONKANEN, R. E. Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serine/threonine protein phosphatase, PP7, that is homologous to Drosophila retinal degeneration C gene product (rdgC). **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 3, p. 1462–1468, 1998.

HUBER, C.; OULÈS, B.; BERTOLI, M. et al. Identification of CANT1 mutations in Desbuquois dysplasia. **American journal of human genetics**, v. 85, n. 5, p. 706–710, 2009.

HUMINIECKI, L.; GOLDOVSKY, L.; FREILICH, S. et al. Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. **BMC evolutionary biology**, v. 9, p. 28, 2009.

HYATT, G.; MELAMED, R.; PARK, R. et al. Gene expression microarrays: glimpses of the immunological genome. **Nature immunology**, v. 7, n. 7, p. 686–691, 2006.

HYÖTY, H.; HILTUNEN, M.; REUNANEN, A. et al. Decline of mumps antibodies in type 1 (insulin-dependent) diabetic children and a plateau in the rising incidence of type 1 diabetes after introduction of the mumps-measles-rubella vaccine in Finland. Childhood Diabetes in Finland Study Group. **Diabetologia**, v. 36, n. 12, p. 1303–1308, 1993.

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, 2006.

INGARAMO, P. I.; RONCO, M. T.; FRANCÉS, D. E. A. et al. Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus. **Molecular immunology**, v. 48, n. 12-13, p. 1397–1407, 2011.

ISHIKAWA, J.; KAISHO, T.; TOMIZAWA, H. et al. Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. **Genomics**, v. 26, n. 3, p. 527–534, 1995.

ISRAËL, A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 3, p. a000158, 2010.

ISSAZADEH-NAVIKAS, S. NKT cell self-reactivity: evolutionary master key of immune homeostasis? **Journal of molecular cell biology**, v. 4, n. 2, p. 70–78, 2012.

JIN, D. Y.; CHAE, H. Z.; RHEE, S. G.; JEANG, K. T. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappaB activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 49, p. 30952–30961, 1997.

JORDAN, B. **Microarrays in Diagnostics and Biomarker Development: Current and Future Applications**. 240 p. 2012.

JUNTA, C. M.; SANDRIN-GARCIA, P.; FACHIN-SALTORATTO, A. L. et al. Differential gene expression of peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients may discriminate immunogenetic, pathogenic and treatment features. **Immunology**, v. 127, n. 3, p. 365–372, 2009.

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, 2007.

KANG, Y.; CHEONG, H.-M.; LEE, J.-H. et al. Protein phosphatase 5 is necessary for ATR-mediated DNA repair. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 404, n. 1, p. 476–481, 2011a.

KANG, Y.; CHEONG, H.-M.; LEE, J.-H. et al. Protein phosphatase 5 is necessary for ATR-mediated DNA repair. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 404, n. 1, p. 476–481, 2011b.

KARJALAINEN, J.; MARTIN, J. M.; KNIP, M; et al. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England journal of medicine**, v. 327, n. 5, p. 302–307, 1992.

KARVONEN, M.; TUOMILEHTO, J.; LIBMAN, I.; LAPORTE, R. A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. World Health Organization DIAMOND Project Group. **Diabetologia**, v. 36, n. 10, p. 883–892, 1993.

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, 2000.

KASSEM, S. A.; ARIEL, I.; THORNTON, P. S. et al. p57(KIP2) expression in normal islet cells and in hyperinsulinism of infancy. **Diabetes**, v. 50, n. 12, p. 2763–2769, 2001.

KATZ, J. D.; WANG, B.; HASKINS, K; BENOIST, C; MATHIS, D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. **Cell**, v. 74, n. 6, p. 1089–1100, 1993.

KIM, J. Y.; LEE, S. H.; SONG, E. H. et al. A critical role of STAT1 in streptozotocin-induced diabetic liver injury in mice: controlled by ATF3. **Cellular signalling**, v. 21, n. 12, p. 1758–1767, 2009.

KISSELEVA, T.; BHATTACHARYA, S.; BRAUNSTEIN, J.; SCHINDLER, C. W. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. **Gene**, v. 285, n. 1-2, p. 1–24, 2002.

KNIP, MIKAEL. Can we predict type 1 diabetes in the general population? **Diabetes care**, v. 25, n. 3, p. 623–625, 2002.

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

KOBATA, T.; AZUMA, M.; YAGITA, H; OKUMURA, K. Role of costimulatory molecules in autoimmunity. **Reviews in immunogenetics**, v. 2, n. 1, p. 74–80, 2000.

KOHANE, I. S.; BUTTE, A. J.; KHO, A. **Microarrays for an Integrative Genomics**. Cambridge, MA, USA: MIT Press, 2002.

KOSCHMIEDER, A.; ZIMMERMANN, K.; TRISSL, S.; STOLTMANN, T.; LESER, U. Tools for managing and analyzing microarray data. **Briefings in bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 46–60, 2012.

KOSTRABA, J. N.; CRUICKSHANKS, K. J.; LAWLER-HEAVNER, J. et al. Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM. **Diabetes**, v. 42, n. 2, p. 288–295, 1993.

KOTAKE, S.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N. et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 103, n. 9, p. 1345–1352, 1999.

KRIEGEL, M. A.; LOHMANN, T.; GABLER, C. et al. Defective suppressor function of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 9, p. 1285–1291, 2004.

KRISTIANSEN, O. P.; LARSEN, Z. M.; POCIOT, F. CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? **Genes and immunity**, v. 1, n. 3, p. 170–184, 2000.

KURELLA, M.; HSIAO, L. L.; YOSHIDA, T. et al. DNA microarray analysis of complex biologic processes. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 12, n. 5, p. 1072–1078, 2001.

KYEWSKI, B.; DERBINSKI, J. Self-representation in the thymus: an extended view. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 9, p. 688–698, 2004.

KYEWSKI, B.; KLEIN, L. A central role for central tolerance. **Annual review of immunology**, v. 24, p. 571–606, 2006.

LACCONE, F.; SCHONER, K.; KRABICHLER, B. et al. Desbuquois dysplasia type I and fetal hydrops due to novel mutations in the CANT1 gene. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 19, n. 11, p. 1133–1137, 2011.

LECH, M.; GARLANDA, C; MANTOVANI, A; et al. Different roles of TIR8/Sigirr on toll-like receptor signaling in intrarenal antigen-presenting cells and tubular epithelial cells. **Kidney international**, v. 72, n. 2, p. 182–192, 2007.

LEE, Y.; CHIN, R. K.; CHRISTIANSEN, P. et al. Recruitment and activation of naive T cells in the islets by lymphotoxin beta receptor-dependent tertiary lymphoid structure. **Immunity**, v. 25, n. 3, p. 499–509, 2006.

LEHUEN, A.; DIANA, J.; ZACCONE, P.; COOKE, A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 7, p. 501–513, 2010.

LEIBOWITZ, U.; ANTONOVSKY, A.; MEDALIE, J. M. et al. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 29, n. 1, p. 60–68, 1966.

LERNER, M.; CORCORAN, M.; CEPEDA, D. et al. The RBCC gene RFP2 (Leu5) encodes a novel transmembrane E3 ubiquitin ligase involved in ERAD. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 5, p. 1670–1682, 2007.

LEVISETTI, M. G.; SURI, A.; FREDERICK, K.; UNANUE, E. R. Absence of lymph nodes in NOD mice treated with lymphotoxin-beta receptor immunoglobulin protects from diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 12, p. 3115–3119, 2004.

LEVY, D. E.; DARNELL, J. E., Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 3, n. 9, p. 651–662, 2002.

LEVY, H.; WANG, X.; KALDUNSKI, M. et al. Transcriptional signatures as a disease-specific and predictive inflammatory biomarker for type 1 diabetes. **Genes and immunity**, v. 13, n. 8, p. 593–604, 2012.

LI, W. X. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. **Trends in cell biology**, v. 18, n. 11, p. 545–551, 2008.

LIEW, C.-C.; MA, J.; TANG, H.-C.; ZHENG, R.; DEMPSEY, A. A. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 147, n. 3, p. 126–132, 2006.

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, 1998.

LIU, T.; FENG, X.-H. Regulation of TGF-beta signalling by protein phosphatases. **The Biochemical journal**, v. 430, n. 2, p. 191–198, 2010.

LIUWANTARA, D.; ELLIOT, M.; SMITH, M. W. et al. Nuclear factor-kappaB regulates beta-cell death: a critical role for A20 in beta-cell protection. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p. 2491–2501, 2006.

LODOLCE, J. P.; KOLODZIEJ, L. E.; RHEE, L. et al. African-derived genetic polymorphisms in TNFAIP3 mediate risk for autoimmunity. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 184, n. 12, p. 7001–7009, 2010.

LOWE, C. E.; COOPER, JASON D; BRUSKO, T. et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. **Nature genetics**, v. 39, n. 9, p. 1074–1082, 2007b.

LUCASSEN, A. M.; JULIER, C; BERESSI, J. P. et al. Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. **Nature genetics**, v. 4, n. 3, p. 305–310, 1993.

LUPPI, P.; CIFARELLI, V.; WAHREN, J. C-peptide and long-term complications of diabetes. **Pediatric diabetes**, v. 12, n. 3 Pt 2, p. 276–292, 2011.

MA, Y.; CHEN, L.; WRIGHT, G. M. et al. CDKN1C negatively regulates RNA polymerase II C-terminal domain phosphorylation in an E2F1-dependent manner. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 13, p. 9813–9822, 2010.

MAAHS, D. M.; OGDEN, L. G.; DABELEA, D. et al. Association of glycaemia with lipids in adults with type 1 diabetes: modification by dyslipidaemia medication. **Diabetologia**, v. 53, n. 12, p. 2518–2525, 2010.

MACEDO, C.; EVANGELISTA, A. F.; MAGALHÃES, D. A. et al. Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. **Molecular immunology**, v. 46, n. 16, p. 3240–3244, 2009.

MAEDLER, K.; SPINAS, G. A.; LEHMANN, R. et al. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1683–1690, 2001.

MALKANI, S.; NOMPLEGGI, D.; HANSEN, J. W. et al. Dietary cow's milk protein does not alter the frequency of diabetes in the BB rat. **Diabetes**, v. 46, n. 7, p. 1133–1140, 1997.

MALONE, J. H.; OLIVER, B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. **BMC biology**, v. 9, p. 34, 2011.

MANDIK-NAYAK, L.; WIPKE, B. T.; SHIH, F. F.; UNANUE, E. R.; ALLEN, P. M. Despite ubiquitous autoantigen expression, arthritogenic autoantibody response initiates in the local lymph node. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 22, p. 14368–14373, 2002.

MANOEL-CAETANO, F. S.; XAVIER, D. J.; EVANGELISTA, A. F. et al. Gene expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus focusing on biological processes implicated on the pathogenesis of the disease. **Gene**, v. 511, n. 2, p. 151–160, 2012.

MANOLI, T.; GRETZ, N.; GRÖNE, H.-J. et al. Group testing for pathway analysis improves comparability of different microarray datasets. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 22, n. 20, p. 2500–2506, 2006.

MÅNSSON, R.; TSAPOGAS, P.; AKERLUND, M. et al. Pearson correlation analysis of microarray data allows for the identification of genetic targets for early B-cell factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17905–17913, 2004.

MÁRQUEZ, A.; OROZCO, G.; MARTÍNEZ, A. et al. Novel association of the interleukin 2-interleukin 21 region with inflammatory bowel disease. **The American journal of gastroenterology**, v. 104, n. 8, p. 1968–1975, 2009.

MARTIN-SANZ, P.; HORTELANO, S.; CALLEJAS, N. A. et al. Nitric oxide in liver inflammation and regeneration. **Metabolic brain disease**, v. 17, n. 4, p. 325–334, 2002.

MATSUDA, A.; SUZUKI, Y.; HONDA, G. et al. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. **Oncogene**, v. 22, n. 21, p. 3307–3318, 2003.

MAURI, C.; BOSMA, A. Immune regulatory function of B cells. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 221–241, 2012.

MAYER, E. J.; HAMMAN, R. F.; GAY, E. C. et al. Reduced risk of IDDM among breast-fed children. The Colorado IDDM Registry. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1625–1632, 1988.

MBBS, A. K. A.; PHD, A. H. L. M.; MD, S. P. **Cellular and Molecular Immunology, Updated Edition: With STUDENT CONSULT Online Access, 6e.** 6^o ed. Saunders, 2009.

MCALEER, J. P.; KOLLS, J. K. Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense. **Journal of leukocyte biology**, v. 90, n. 2, p. 263–270, 2011.

MCCOY, K. L.; TRAYNELIS, S. F.; HEPLER, J. R. PAR1 and PAR2 couple to overlapping and distinct sets of G proteins and linked signaling pathways to differentially regulate cell physiology. **Molecular pharmacology**, v. 77, n. 6, p. 1005–1015, 2010.

MELANITOU, E.; FAIN, P.; EISENBARTH, GEORGE S. Genetics of type 1A (immune mediated) diabetes. **Journal of autoimmunity**, v. 21, n. 2, p. 93–98, 2003.

METZGER, T. C.; ANDERSON, M. S. Control of central and peripheral tolerance by Aire. **Immunological reviews**, v. 241, n. 1, p. 89–103, 2011.

MIYAJIMA, A.; KITAMURA, T.; HARADA, N.; YOKOTA, T.; ARAI, K. Cytokine receptors and signal transduction. **Annual review of immunology**, v. 10, p. 295–331, 1992.

MOHR, A.; CHATAIN, N.; DOMOSZLAI, T. et al. Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling. **European journal of cell biology**, v. 91, n. 6-7, p. 524–532, 2012.

MOOTHA, V. K.; LINDGREN, C. M.; ERIKSSON, K.-F. et al. PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nature genetics**, v. 34, n. 3, p. 267–273, 2003.

MOSCAT, J.; DIAZ-MECO, M. T. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1001–1004, 2009.

MOSER, B.; LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nature immunology**, v. 2, n. 2, p. 123–128, 2001.

MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C.-H. The regulation of TGFbeta signal transduction. **Development (Cambridge, England)**, v. 136, n. 22, p. 3699–3714, 2009.

MURPHY, K. M.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Janeway's Immunobiology (Immunobiology: The Immune System.** 7^o ed. Garland Science, 2007.

NAKAYAMA, MAKI; NAGATA, MASAO; YASUDA, HISAFUMI; et al. Fas/Fas ligand interactions play an essential role in the initiation of murine autoimmune diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1391–1397, 2002.

NAKAZAWA, T.; TAKASAWA, SHIN; NOGUCHI, NAOYA; et al. Genomic organization, chromosomal localization, and promoter of human gene for FK506-binding protein 12.6. **Gene**, v. 360, n. 1, p. 55–64, 2005.

NAM, D.; KIM, SEON-YOUNG. Gene-set approach for expression pattern analysis. **Briefings in bioinformatics**, v. 9, n. 3, p. 189–197, 2008.

NEURATH, M. F.; FINOTTO, S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 2, p. 83–89, 2011.

NIELSEN, E.-M. D.; HANSEN, L.; STISSING, T. et al. Studies of variations of the cyclin-dependent kinase inhibitor 1C and the cyclin-dependent kinase 4 genes in relation to type 2 diabetes mellitus and related quantitative traits. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 83, n. 5, p. 353–361, 2005.

NISTICÒ, L.; BUZZETTI, R.; PRITCHARD, L. E. et al. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. **Human molecular genetics**, v. 5, n. 7, p. 1075–1080, 1996.

NOGUCHI, N; TAKASAWA, S; NATA, K; et al. Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release Ca²⁺ from islet microsomes. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3133–3136, 1997.

NORRIS, J M; BEATY, B.; KLINGENSMITH, G. et al. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 276, n. 8, p. 609–614, 1996.

O'SHEA, J. J.; GADINA, M.; SCHREIBER, R. D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. **Cell**, v. 109 Suppl, p. S121–131, 2002.

OECKINGHAUS, A.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. **Nature immunology**, v. 12, n. 8, p. 695–708, 2011.

ORBAN, T.; SOSENKO, J. M.; CUTHBERTSON, D. et al. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. **Diabetes care**, v. 32, n. 12, p. 2269–2274, 2009.

OU, D.; MITCHELL, L. A.; METZGER, D. L.; GILLAM, S.; TINGLE, A. J. Cross-reactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognised by T cells of patients with type I diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 43, n. 6, p. 750–762, 2000.

PAINTER, M. W.; DAVIS, S.; HARDY, R. R.; MATHIS, DIANE; BENOIST, CHRISTOPHE. Transcriptomes of the B and T lineages compared by multiplatform microarray profiling. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 186, n. 5, p. 3047–3057, 2011.

PASSOS, G.A.S.; NGUYEN, C.; JORDAN, B. Projeto Transcriptoma – Análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v.12, p.34-37, 2000.

PATEL, P.; MACEROLLO, A. Diabetes mellitus: diagnosis and screening. **American family physician**, v. 81, n. 7, p. 863–870, 2010.

PATTERSON, C. C.; DAHLQUIST, G.; SOLTÉSZ, G.; GREEN, A. Is childhood-onset type I diabetes a wealth-related disease? An ecological analysis of European incidence rates. **Diabetologia**, v. 44 Suppl 3, p. B9–16, 2001.

PESCOVITZ, M. D.; GREENBAUM, C. J.; KRAUSE-STEINRAUF, H. et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 22, p. 2143–2152, 2009.

PETROVSKY, N.; SILVA, D.; SOCHA, L.; SLATTERY, R.; CHARLTON, B. The role of Fas ligand in beta cell destruction in autoimmune diabetes of NOD mice. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 958, p. 204–208, 2002.

PLAGNOL, V.; HOWSON, JOANNA M M; SMYTH, DEBORAH J; et al. Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. **PLoS genetics**, v. 7, n. 8, p. e1002216, 2011.

POBEZINSKAYA, Y. L.; CHOKSI, S.; MORGAN, M. J.; CAO, X.; LIU, Z. The adaptor protein TRADD is essential for TNF-like ligand 1A/death receptor 3 signaling. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 186, n. 9, p. 5212–5216, 2011.

POCIOT, FLEMMING; AKOLKAR, B.; CONCANNON, PATRICK; et al. Genetics of type 1 diabetes: what's next? **Diabetes**, v. 59, n. 7, p. 1561–1571, 2010.

POLENTARUTTI, N.; ROL, G. P.; MUZIO, M. et al. Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR. **European cytokine network**, v. 14, n. 4, p. 211–218, 2003.

POLYCHRONAKOS, CONSTANTIN; LI, Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 11, p. 781–792, 2011.

PRIMER3: WWW primer tool. Desenvolvido por: Steve Rozen e Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research. Ferramenta de Bioinformática para a construção de primers. Disponível em: < http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi> Acesso em: 24 set. 2012.

PUGLIESE, A.; GIANANI, R.; MOROMISATO, R. et al. HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. **Diabetes**, v. 44, n. 6, p. 608–613, 1995.

PUGLIESE, A.; ZELLER, M.; FERNANDEZ, A., Jr; et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. **Nature genetics**, v. 15, n. 3, p. 293–297, 1997.

QUACKENBUSH, J. Computational analysis of microarray data. **Nature reviews. Genetics**, v. 2, n. 6, p. 418–427, 2001.

QUEZADA, S. A.; ECKERT, M.; ADEYI, O. A. et al. Distinct mechanisms of action of anti-CD154 in early versus late treatment of murine lupus nephritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 48, n. 9, p. 2541–2554, 2003.

RABINOVITCH, A.; SUAREZ-PINZON, W. L.; SORENSEN, O. Interleukin 12 mRNA expression in islets correlates with beta-cell destruction in NOD mice. **Journal of autoimmunity**, v. 9, n. 5, p. 645–651, 1996.

RAHMAN, A.; ISENBERG, D. A. Systemic lupus erythematosus. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 9, p. 929–939, 2008.

RAJSBAUM, R.; STOYE, J. P.; O’GARRA, A. Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. **European journal of immunology**, v. 38, n. 3, p. 619–630, 2008.

RAMSEY, C. D.; LAZARUS, R.; CAMARGO, C. A., Jr; WEISS, S. T.; CELEDÓN, J. C. Polymorphisms in the interleukin 17F gene (IL17F) and asthma. **Genes and immunity**, v. 6, n. 3, p. 236–241, 2005.

RASSI, DIANE M; JUNTA, CRISTINA M; FACHIN, A. L. et al. Metabolism genes are among the differentially expressed ones observed in lymphomononuclear cells of recently diagnosed type 1 diabetes mellitus patients. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1079, p. 171–176, 2006.

RASSI, DIANE MEYRE; JUNTA, CRISTINA MORAES; 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, 2008.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 8, p. 1281–1283, 2004.

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.

REIMERS, M. Making informed choices about microarray data analysis. **PLoS computational biology**, v. 6, n. 5, p. e1000786, 2010.

REYMOND, A.; MERONI, G.; FANTOZZI, A. et al. The tripartite motif family identifies cell compartments. **The EMBO journal**, v. 20, n. 9, p. 2140–2151, 2001.

ROEP, B. O. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia**, v. 46, n. 3, p. 305–321, 2003.

ROITT, I.; DELVES, P. **Roitt's Essential Immunology, Tenth Edition**. 10^o ed. Wiley-Blackwell, 2001.

RONCAROLO, M.-G.; BATTAGLIA, M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 8, p. 585–598, 2007.

ROOK, G A W. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: darwinian medicine and the “hygiene” or “old friends” hypothesis. **Clinical and experimental immunology**, v. 160, n. 1, p. 70–79, 2010.

ROOK, GRAHAM A W. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 42, n. 1, p. 5–15, 2012.

ROSA, J. S.; OLIVER, S. R.; MITSUHASHI, M. et al. Altered kinetics of interleukin-6 and other inflammatory mediators during exercise in children with type 1 diabetes. **Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research**, v. 56, n. 4, p. 701–713, 2008.

RYBA, M.; MAREK, N.; HAK, Ł. et al. Anti-TNF rescue CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in patients with type 1 diabetes from effects mediated by TNF. **Cytokine**, v. 55, n. 3, p. 353–361, 2011.

SABBAH, MICHÈLE; SAUCIER, C.; REDEUILH, GÉRARD. Human B-ind1 gene promoter: cloning and regulation by histone deacetylase inhibitors. **Gene**, v. 374, p. 128–133, 2006.

SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: history and perspective. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 707, p. 3–17, 2011.

SANTIBANEZ, J. F.; BLANCO, F. J.; GARRIDO-MARTIN, E. M. et al. Caveolin-1 interacts and cooperates with the transforming growth factor-beta type I receptor ALK1 in endothelial caveolae. **Cardiovascular research**, v. 77, n. 4, p. 791–799, 2008.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science (New York, N.Y.)**, v. 270, n. 5235, p. 467–470, 1995.

SCHINDLER, C.; PLUMLEE, C. Interferons pen the JAK-STAT pathway. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 19, n. 4, p. 311–318, 2008.

SELVARAJ, S.; NATARAJAN, J. Microarray data analysis and mining tools. **Bioinformation**, v. 6, n. 3, p. 95–99, 2011.

SHAH, B. H.; CATT, K. J. Protein phosphatase 5 as a negative key regulator of Raf-1 activation. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 17, n. 10, p. 382–384, 2006.

SHELBAYA, S.; AMER, H.; SEDDIK, S. et al. Study of the role of interleukin-6 and highly sensitive C-reactive protein in diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 16, n. 2, p. 176–182, 2012.

SHI, L.; REID, L. H.; JONES, W. D. et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 9, p. 1151–1161, 2006.

SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 685–700, 2003.

SHIN, H. D.; YANG, S. W.; KIM, D. H.; PARK, Y. Independent association of tumor necrosis factor polymorphism with type 1 diabetes susceptibility. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1150, p. 76–85, 2008.

SKAUG, B.; CHEN, J.; DU, F. et al. Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20. **Molecular cell**, v. 44, n. 4, p. 559–571, 2011.

SKOWERA, A.; ELLIS, R. J.; VARELA-CALVIÑO, R. et al. CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 10, p. 3390–3402, 2008.

SNELL-BERGEON, J. K.; WEST, N. A.; MAYER-DAVIS, E. J. et al. Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH Case-Control study. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 6, p. 2868–2876, 2010.

SOH, U. J. K.; TREJO, J. Activated protein C promotes protease-activated receptor-1 cytoprotective signaling through β -arrestin and dishevelled-2 scaffolds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 50, p. E1372–1380, 2011.

STAAL, F. J.; ANDERSON, M. T.; HERZENBERG, L. A. Redox regulation of activation of NF-kappa B transcription factor complex: effects of N-acetylcysteine. **Methods in enzymology**, v. 252, p. 168–174, 1995.

Standards of Medical Care in Diabetes--2012. **Diabetes Care**, v. 35, n. Supplement_1, p. S11–S63, 2011. Acesso em: 20/11/2012.

STECK, A K; BASCHAL, E. E.; JASINSKI, J. M. et al. rs2476601 T allele (R620W) defines high-risk PTPN22 type I diabetes-associated haplotypes with preliminary evidence for an additional protective haplotype. **Genes and immunity**, v. 10 Suppl 1, p. S21–26, 2009.

STICHTENOTH, D. O.; FRÖLICH, J. C. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. **British journal of rheumatology**, v. 37, n. 3, p. 246–257, 1998.

SUBRAMANIAN, A.; TAMAYO, P.; MOOTHA, V. K. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 2005.

SUZUKI, H.; KÜNDIG, T. M.; FURLONGER, C. et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5216, p. 1472–1476, 1995.

SZELACHOWSKA, M.; KRETOWSKI, A.; KINALSKA, I. Increased in vitro interleukin-12 production by peripheral blood in high-risk IDDM first degree relatives. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 29, n. 4, p. 168–171, 1997.

T1DBase - Home Page. Disponível em: <<http://www.t1dbase.org/page/Welcome/display>>. Acesso em: 10/10/2012.

TARGHER, G.; BERTOLINI, L.; ZOPPINI, G.; ZENARI, L.; FALEZZA, G. Increased plasma markers of inflammation and endothelial dysfunction and their association with microvascular complications in Type 1 diabetic patients without clinically manifest macroangiopathy. **Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 22, n. 8, p. 999–1004, 2005.

TARGHER, G.; CHONCHOL, M.; ZOPPINI, G.; FRANCHINI, M. Hemostatic disorders in type 1 diabetes mellitus. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 37, n. 1, p. 58–65, 2011.

TAYLOR, A. W. Review of the activation of TGF-beta in immunity. **Journal of leukocyte biology**, v. 85, n. 1, p. 29–33, 2009.

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

THELEN, M. Dancing to the tune of chemokines. **Nature immunology**, v. 2, n. 2, p. 129–134, 2001.

TIBSHIRANI, E.; EFRON, B. On Testing The Significance Of Sets Of Genes. **The Annals Of Applied Statistics**. v. 01, n. 01, p. 107 – 129, 2007.

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

TOMAR, D.; SINGH, ROCHIKA; SINGH, A. K.; PANDYA, C. D.; SINGH, RAJESH. TRIM13 regulates ER stress induced autophagy and clonogenic ability of the cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1823, n. 2, p. 316–326, 2012.

TOUBI, E.; SHOENFELD, Y. The role of CD40-CD154 interactions in autoimmunity and the benefit of disrupting this pathway. **Autoimmunity**, v. 37, n. 6-7, p. 457–464, 2004.

TUMANOV, A. V.; CHRISTIANSEN, P. A.; FU, Y.-X. The role of lymphotoxin receptor signaling in diseases. **Current molecular medicine**, v. 7, n. 6, p. 567–578, 2007.

TZARTOS, J. S.; FRIESE, M. A.; CRANER, M. J. et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. **The American journal of pathology**, v. 172, n. 1, p. 146–155, 2008.

VAITAITIS, G. M.; WAGNER, D. H., Jr. High distribution of CD40 and TRAF2 in Th40 T cell rafts leads to preferential survival of this auto-aggressive population in autoimmunity. **PloS one**, v. 3, n. 4, p. e2076, 2008.

VAN BEELEN, A. J.; TEUNISSEN, M. B. M.; KAPSENBERG, M. L.; DE JONG, E. C. Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 7, n. 5, p. 374–381, 2007.

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

VAN HEEL, D. A.; FRANKE, L.; HUNT, K. A. et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. **Nature genetics**, v. 39, n. 7, p. 827–829, 2007.

VAN LIMBERGEN, J.; WILSON, D. C.; SATSANGI, J. The genetics of Crohn's disease. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 10, p. 89–116, 2009.

VASCONCELLOS, R.; CARTER, N. A.; ROSSER, E. C.; MAURI, C. IL-12p35 subunit contributes to autoimmunity by limiting IL-27-driven regulatory responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 187, n. 6, p. 3402–3412, 2011.

VELLA, A.; COOPER, JASON D; LOWE, C. E. et al. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 76, n. 5, p. 773–779, 2005.

VIGLIETTA, V.; BAECHER-ALLAN, C.; WEINER, H. L.; HAFLER, D. A. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 7, p. 971–979, 2004.

VON HERRATH, M. G.; FUJINAMI, R. S.; WHITTON, J. L. Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile? **Nature reviews. Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 151–157, 2003.

WATFORD, W. T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J. J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 14, n. 5, p. 361–368, 2003.

WECHSLER, T.; CHEN, B. P. C.; HARPER, R. et al. DNA-PKcs function regulated specifically by protein phosphatase 5. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 5, p. 1247–1252, 2004.

WEN, H.; KANG, S.; SONG, YOUNGMIN; et al. Characterization of the binding sites for the interactions between FKBP12 and intracellular calcium release channels. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 517, n. 1, p. 37–42, 2012.

WEN, L.; LEY, R. E.; VOLCHKOV, P. Y. et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1109–1113, 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, 2007.

WERTZ, I. E.; DIXIT, V. M. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 1, p. 14–24, 2010.

WU, M. C.; LIN, X. Prior biological knowledge-based approaches for the analysis of genome-wide expression profiles using gene sets and pathways. **Statistical methods in medical research**, v. 18, n. 6, p. 577–593, 2009.

XIAO, H.; GULEN, M. F.; QIN, J. et al. The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 461–475, 2007.

XIE, P.; HOSTAGER, B. S.; MUNROE, M. E.; MOORE, C. R.; BISHOP, G. A. Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 176, n. 9, p. 5388–5400, 2006.

XU, Y.; ZHANG, C.; WANG, N. et al. Adiponectin inhibits lymphotoxin- β receptor-mediated NF- κ B signaling in human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 404, n. 4, p. 1060–1064, 2011.

YOO, H.; PARK, S.-H.; YE, S.-K.; KIM, M. IFN- γ -induced BST2 mediates monocyte adhesion to human endothelial cells. **Cellular immunology**, v. 267, n. 1, p. 23–29, 2011.

YOSHIDA, K.; CORPER, ADAM L; HERRO, R. et al. The diabetogenic mouse MHC class II molecule I-Ag7 is endowed with a switch that modulates TCR affinity. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 5, p. 1578–1590, 2010.

ZHANG, Q.; PUTHETI, P.; ZHOU, Q.; LIU, Q.; GAO, W. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 19, n. 5-6, p. 347–356, 2008.

ZHANG, Y. E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. **Cell research**, v. 19, n. 1, p. 128–139, 2009.

ZIPITIS, C. S.; AKOBENG, A. K. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Archives of disease in childhood**, v. 93, n. 6, p. 512–517, 2008.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121–127, 2000.

ZORENA, K.; MYŚLIWSKA, J.; MYŚLIWIEC, M. et al. Serum TNF-alpha level predicts nonproliferative diabetic retinopathy in children. **Mediators of inflammation**, v. 2007, p. 92196, 2007.

ANEXOS

11 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

79
A
HCRP
USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

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 (IGH-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

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/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.07)
 Result Flagging Color: PASS
 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/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.07)
 Result Flagging Color: PASS
 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/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.07)
 Result Flagging Color: PASS
 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/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.6
 RNA Integrity Number (RIN): 9.5 (B.02.07)
 Result Flagging Color: PASS
 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/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.7
 RNA Integrity Number (RIN): 9.4 (B.02.07)
 Result Flagging Color: PASS
 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/μl
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 1.5
 RNA Integrity Number (RIN): 9.3 (B.02.07)
 Result Flagging Color: PASS
 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 Flapping Color: 9.5
 Result Flapping Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 2 : DMI-13

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.96	42.47	200.0	21.8
28S	48.30	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 Flapping Color: 9.5
 Result Flapping Label: RIN: 9.50

Fragment table for sample 3 : DMI-14

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.96	42.32	185.7	22.1
28S	48.31	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 Flapping Color: 9.4
 Result Flapping 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	48.81	49.64	262.4	32.3

Overall Results for sample 6 : 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 Flapping Color: 9.3
 Result Flapping Label: RIN: 9.30

Fragment table for sample 6 : DMI-16

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.85	42.22	171.0	20.2
28S	48.46	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 Flapping Color: 9.3
 Result Flapping 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	42.29	174.9	20.0
28S	48.10	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 Flapping Color: 9.4
 Result Flapping 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	48.14	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 Flapping Color: 9.4
 Result Flapping 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

ANEXO D

<i>Gene set</i>	<i>Nome do gene set</i>	<i>p-value</i>
1336	ENDONUCLEASE_ACTIVITY	0.01
122	HETEROGENEOUS_NUCLEAR_RIBONUCLEOPROTEIN_COMPLEX	0.01
829	INACTIVATION_OF_MAPK_ACTIVITY	0.01
177	INTRACELLULAR_NON_MEMBRANE_BOUND_ORGANELLE	0.01
518	LIPOPROTEIN_METABOLIC_PROCESS	0.01
910	MRNA_METABOLIC_PROCESS	0.01
706	MRNA_PROCESSING_GO_0006397	0.01
410	NEGATIVE_REGULATION_OF_IMMUNE_SYSTEM_PROCESS	0.01
765	NEGATIVE_REGULATION_OF_MAP_KINASE_ACTIVITY	0.01
71	NON_MEMBRANE_BOUND_ORGANELLE	0.01
167	NUCLEOPLASM_PART	0.01
814	PEPTIDYL_TYROSINE_MODIFICATION	0.01
769	PEPTIDYL_TYROSINE_PHOSPHORYLATION	0.01
905	PHOSPHOINOSITIDE_METABOLIC_PROCESS	0.01
721	POSITIVE_REGULATION_OF_PROTEIN_SECRETION	0.01
439	POST_GOLGI_VESICLE_MEDIATED_TRANSPORT	0.01
619	POST_TRANSLATIONAL_PROTEIN_MODIFICATION	0.01
205	PROTEIN_COMPLEX	0.01
498	PROTEIN_DNA_COMPLEX_ASSEMBLY	0.01
852	REGULATION_OF_CYTOSKELETON_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	0.01
489	RNA_ELONGATION	0.01
924	RNA_SPLICING	0.01
389	SULFUR_COMPOUND_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.01
623	VACUOLAR_TRANSPORT	0.01
724	BIOPOLYMER_MODIFICATION	0.02
367	BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.02
401	HETEROPHILIC_CELL_ADHESION	0.02
182	INTRACELLULAR_ORGANELLE_PART	0.02
183	MACROMOLECULAR_COMPLEX	0.02
707	MACROMOLECULE_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.02
146	MEMBRANE_ENCLOSED_LUMEN	0.02
423	MONOVALENT_INORGANIC_CATION_HOMEOSTASIS	0.02
69	NUCLEAR_LUMEN	0.02
61	NUCLEAR_PART	0.02
185	NUCLEOLAR_PART	0.02
1	NUCLEOPLASM	0.02
463	NUCLEOSOME_ASSEMBLY	0.02
64	ORGANELLE_LUMEN	0.02
3	ORGANELLE_PART	0.02
621	POSITIVE_REGULATION_OF_CYTOKINE_SECRETION	0.02
797	POSITIVE_REGULATION_OF_CYTOSKELETON_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	0.02

1347	POTASSIUM_CHANNEL_REGULATOR_ACTIVITY	0.02
911	PROTEIN_MODIFICATION_PROCESS	0.02
479	REGULATION_OF_PEPTIDYL_TYROSINE_PHOSPHORYLATION	0.02
333	REGULATION_OF_TYROSINE_PHOSPHORYLATION_OF_STAT_PROTEIN	0.02
997	RESPONSE_TO_DNA_DAMAGE_STIMULUS	0.02
350	RESPONSE_TO_ENDOGENOUS_STIMULUS	0.02
843	RESPONSE_TO_IONIZING_RADIATION	0.02
1217	RNA_POLYMERASE_II_TRANSCRIPTION_FACTOR_ACTIVITYENHANCER_BINDING	0.02
605	RNA_PROCESSING	0.02
1133	RNA_SPLICING_FACTOR_ACTIVITYTRANSESTERIFICATION_MECHANISM	0.02
811	RNA_SPLICINGVIA_TRANSESTERIFICATION_REACTIONS	0.02
258	SPLICEOSOME_ASSEMBLY	0.02
524	ACTIVATION_OF_NF_KAPPAB_TRANSCRIPTION_FACTOR	0.03
908	CDC42_PROTEIN_SIGNAL_TRANSDUCTION	0.03
32	CHROMATIN	0.03
60	CORNIFIED_ENVELOPE	0.03
1283	ENDORIBONUCLEASE_ACTIVITY	0.03
1207	HISTONE_DEACETYLASE_BINDING	0.03
1305	INOSITOL_OR_PHOSPHATIDYLINOSITOL_PHOSPHATASE_ACTIVITY	0.03
668	KERATINOCYTE_DIFFERENTIATION	0.03
434	MAINTENANCE_OF_CELLULAR_LOCALIZATION	0.03
763	MAINTENANCE_OF_CELLULAR_PROTEIN_LOCALIZATION	0.03
1240	N_METHYLTRANSFERASE_ACTIVITY	0.03
284	NEGATIVE_REGULATION_OF_DNA_METABOLIC_PROCESS	0.03
805	NEGATIVE_REGULATION_OF_DNA_REPLICATION	0.03
559	POSITIVE_REGULATION_OF_CASPASE_ACTIVITY	0.03
645	POSITIVE_REGULATION_OF_TRANSCRIPTION_FACTOR_ACTIVITY	0.03
798	PROTEIN_AMINO_ACID_O_LINKED_GLYCOSYLATION	0.03
595	PROTEIN_EXPORT_FROM_NUCLEUS	0.03
1199	PROTEIN_KINASE_ACTIVITY	0.03
486	PROTEOGLYCAN_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.03
628	REGULATION_OF_ORGANELLE_ORGANIZATION_AND_BIOGENESIS	0.03
964	REGULATION_OF_PROTEIN_SECRETION	0.03
252	REGULATION_OF_RHO_PROTEIN_SIGNAL_TRANSDUCTION	0.03
375	REGULATION_OF_TRANSFERASE_ACTIVITY	0.03
243	REGULATION_OF_TRANSFORMING_GROWTH_FACTOR_BETA_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.03
29	RIBONUCLEOPROTEIN_COMPLEX	0.03
230	SOLUBLE_FRACTION	0.03
89	SYNAPTIC_VESICLE	0.03
202	TRANSCRIPTION_FACTOR_COMPLEX	0.03
1301	TUBULIN_BINDING	0.03
1001	TYROSINE_PHOSPHORYLATION_OF_STAT_PROTEIN	0.03
914	AMYLOID_PRECURSOR_PROTEIN_METABOLIC_PROCESS	0.04
1083	ANTIPORTER_ACTIVITY	0.04
1178	BETA_TUBULIN_BINDING	0.04

461	CALCIUM_MEDIATED_SIGNALING	0.04
1056	CASPASE_ACTIVATION	0.04
1125	CATION_TRANSPORTING_ATPASE_ACTIVITY	0.04
1215	CHAPERONE_BINDING	0.04
52	CHROMATIN_REMODELING_COMPLEX	0.04
325	COFACTOR_METABOLIC_PROCESS	0.04
496	DEPHOSPHORYLATION	0.04
147	DNA_DIRECTED_RNA_POLYMERASEII_HOLOENZYME	0.04
819	ER_TO_GOLGI_VESICLE_MEDIATED_TRANSPORT	0.04
337	FOCAL_ADHESION_FORMATION	0.04
240	GLUCAN_METABOLIC_PROCESS	0.04
259	GLYCEROPHOSPHOLIPID_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.04
820	HISTONE_MODIFICATION	0.04
296	INSULIN_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0.04
1307	LIPID_KINASE_ACTIVITY	0.04
865	MAPKKK_CASCADE_GO_0000165	0.04
746	NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_PROLIFERATION	0.04
229	NUCLEOLUS	0.04
80	NUCLEUS	0.04
272	POSITIVE_REGULATION_OF_SIGNAL_TRANSDUCTION	0.04
693	PROTEIN_SECRETION	0.04
886	REGULATION_OF_NUCLEOBASENUCLEOSIDENUCLEOTIDE_AND_NUCLEI C_ACID_METABOLIC_PROCESS	0.04
571	REGULATION_OF_PH	0.04
305	REGULATION_OF_PROTEIN_KINASE_ACTIVITY	0.04
1004	REGULATION_OF_TRANSCRIPTION	0.04
214	RIBOSOMAL_SUBUNIT	0.04
143	RIBOSOME	0.04
1113	SECONDARY_ACTIVE_TRANSMEMBRANE_TRANSPORTER_ACTIVITY	0.04
223	TRANS_GOLGI_NETWORK_TRANSPORT_VESICLE	0.04
933	TRANSCRIPTION_FROM_RNA_POLYMERASE_III_PROMOTER	0.04
1289	TRANSCRIPTION_REPRESSOR_ACTIVITY	0.04
1290	TRANSFERASE_ACTIVITY_TRANSFERRING_ALKYL_OR_ARYLOTHER_THA N_METHYLGROUPS	0.04
1449	CASPASE_REGULATOR_ACTIVITY	0.05
503	COENZYME_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.05
373	COENZYME_METABOLIC_PROCESS	0.05
925	COFACTOR_BIOSYNTHETIC_PROCESS	0.05
331	FEMALE_GAMETE_GENERATION	0.05
275	G_PROTEIN_SIGNALING_ADENYLATE_CYCLASE_INHIBITING_PATHWAY	0.05
321	MACROMOLECULAR_COMPLEX_ASSEMBLY	0.05
35	MEMBRANE_BOUND_VESICLE	0.05
1158	MICROTUBULE_BINDING	0.05
113	MITOCHONDRIAL_LUMEN	0.05
100	MITOCHONDRIAL_MATRIX	0.05
1275	PHOSPHOINOSITIDE_BINDING	0.05
392	POSITIVE_REGULATION_OF_BINDING	0.05

617	POSITIVE_REGULATION_OF_DEVELOPMENTAL_PROCESS	0.05
613	REGULATION_OF_GENE_EXPRESSION	0.05
264	REGULATION_OF_HYDROLASE_ACTIVITY	0.05
301	REGULATION_OF_KINASE_ACTIVITY	0.05
928	REGULATION_OF_RNA_METABOLIC_PROCESS	0.05
703	REGULATION_OF_TRANSCRIPTIONDNA_DEPENDENT	0.05
710	RNA_EXPORT_FROM_NUCLEUS	0.05
1130	SOLUTE_SODIUM_SYMPORTER_ACTIVITY	0.05
452	SUPEROXIDE_METABOLIC_PROCESS	0.05
955	TRANSLATION	0.05
234	TRNA_PROCESSING	0.05
74	VESICLE	0.05
1118	ZINC_ION_BINDING	0.05