Débora Teixeira de Oliveira Mainardi Novo

Estudo da região promotora do gene da interleucina (IL-21) e do poliformismo do gene tirosina fosfatase, tipo não receptor 22 (PTPN22): Associação com auto-anticorpos em pacientes portadores de Diabetes Mellitos Tipo 1A

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

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva

SÃO PAULO
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mainardi-Novo, Débora Teixeira de Oliveira
Estudo da região promotora do gene da interleucina (IL-21) e do poliformismo do gene tirosina fosfatase, tipo não receptor 22 (PTPN22): Associação com auto-anticorpos em pacientes portadores de Diabetes Mellitos Tipo 1A / Débora Teixeira de Oliveira Mainardi Novo. -- São Paulo, 2011.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Maria Elizabeth Rossi da Silva.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1 2.Auto-imunidade 3.Interleucina-21 4.Citocinas 5.Polimorfismo genético 6.Auto-anticorpos 7.Doenças auto-imunes

USP/FM/DBD-163/11

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio LIM-18 da Disciplina de endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com a colaboração do L Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 e do Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências - LIM56. Este trabalho contou com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São PAULO (FAPESP): 2006/06390-1.

Dedicatória

Dedico esta tese de doutorado às minhas filhas, Heloísa e Laís, e aos meus pais, Ayre e Dirceu. Aos meus genitores pela oportunidade da vida sob orientação e formação incansáveis de retidão, responsabilidade, amor e continência, e às minhas filhas, Helô e Lála, pela oportunidade de aprendizado, aplicação e aprimoramento dessas condições sob o exercício da maternidade concomitante à formação médica, com uma compreensão ímpar deste momento, e amor incondicional. Muito obrigada!

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, Maria Elizabeth Rossi da Silva, que acreditou no meu potencial e gerou condições para que eu desenvolvesse este trabalho no LIM-18, e sob seu olhar e orientação tive a oportunidade de aprendizado e evolução, tanto na minha formação científica quanto de vida.

Dewton Moraes Vasconcelos, meu co-orientador de “fato”, trabalhou com paciência e profundidade os conceitos da Imunologia ligados ao diabetes, e, em aprendizado contínuo, deu-me suporte de conhecimento para esta tese.

Dalva Marreiro Rocha, que me recebeu de braços abertos quando cheguei ao LIM-18, há quase 9 anos, e sempre suportando a mim e aos meus colegas, nos pontos que acreditava poderíamos melhorar. Entusiasta às novidades, inclusive à minha ida à Universidade do Colorado em Denver.

Rosa Ferreira Santos agradeço às suas idéias, sempre muito otimistas, e ao apoio, fundamentalmente importante, para minha ida à Denver,

Professora Berenice Bilharinho de Mendonça, que muito admiro, agradeço poder trabalhar na Disciplina de Endocrinologia, que sob sua direção justa, ética e transparente fez a disciplina crescer e formalizar essas características em exemplo para todos nós.

Ana Cláudia Latrônico, professora titular, também, de minha admiração, traz na sua essência a educação, e desta forma, ajudou-me ainda do “boneco” desta tese, acreditando no simples.

George Eisenbarth, agradeço por me receber de forma profissional e amistosa, em seu serviço Barbara Davis Center, em Denver na Universidade do Colorado, e por suas valiosas orientações.

Exército Brasileiro – Comando Militar do Sudeste, fundamental importância para o grupo controle da minha tese, a agilidade, ética, precisão e pontualidade, fizeram de nossas coletas em diversos locais de São Paulo, algo viável desde o transporte até coleta das amostras, e finalização com os bons resultados.

Lindiane Crisóstomo, companheira de teses “gêmeas”, sua ajuda, seu companheirismo e objetividade, ajudaram-me muito na organização de minha tese. Quanto às viagens, congressos, palestras dividimos experiências que ajudaram para o crescimento desta fase.

Ao colega Cristóvão Pitangueira Mangueira pela atenção e apoio, juntamente com a equipe do Laboratório Central do HC FMUSP.

Marlene Inácio, quase que como uma orientadora emocional, esta amiga e colega de pós, ajudou-me a buscar dentro da razão uma força real para reiniciar, quando o esmorecimento se fazia maior.

Agradeço com carinho e com boas lembranças à equipe do LIM-18: Rosa Fukui profissional responsável e muito organizada, Emília Modolo Pinto pelo aprendizado em seqüenciamento genético, Márcia Gamberini aos conhecimentos de biologia molecular, Adriana Rosa e Greci Paula pelo trabalho e organização das coletas no Exército Brasileiro. À querida Maria de Fátima Sanches pelo carinho contínuo e suas palavras afetuosas. Aritania Santos pelo trabalho incansável diante das adversidades e apoio amigo. Maria José Pegoraro agradeço seu secretariado organizado, aprendi também, e Márcia Regina Corrêa**.**

Nilce Bérgamo, pelo início de tudo no LIM-18, com organização das pastas, questionários e tabelas dos diabéticos tipo 1A do ambulatório de terça de manhã. Nas tardes, e sábados, que de forma incansável trabalhávamos juntas. Lyz Locoselli, também estendo meu agradecimento.

Aritania Santos, Elaine Davini, Jéssica Fores, Kátia Nogueira, Maysa Sousa, Renata Mattioli, Teresa Mattana, , Vinicius Costa meus amigos de pós, agradeço aos inúmeros apoios oportunos, sempre dispostos a ajudar.

Maria Aparecida da Silva, a nossa “Cida da pós”, que conseguiu conciliar de forma muito harmoniosa a flexibilidade inerente ao ser humano com as condições rigorosas do curso da pós. E à Rosana Zamboni agradeço sua sempre pronta colaboração.

Marinalva Aragão**,** sua paciência e profissionalismo, que com limites claros, fez a tarefa catalográfica ficar leve.

Aos pacientes e familiares pela oportunidade de trabalho e contribuição científica.

Aos funcionários da Endocrinologia do HC FMUSP e a todos que de forma direta ou indireta participaram desta tese.

Aos amigos de vida Charles Klepacz, Diana Galtieri, Luciana Saddi, Marlene Inácio, Maura Curci, Walkiria e Fernando Chaim amigos que sempre pude contar para todas as horas nesses anos de doutorado.

Às minhas irmãs Denise T. O. Mattar e Daniella T. O. Franken foram fundamentais para que, dentro da gema familiar, eu pudesse receber apoio para esta jornada de forte demanda.

Aos meus cunhados Felipe Mattar e Marcelo Franken, pelo apoio familiar, sendo ótimos esposos e pais ainda melhores. Cabe aqui, meu reconhecimento,

às idéias médico-científico trocadas, sempre acompanhadas de bom senso, com meu colega e cunhado, Marcelo.

Aos meus pais Ayre e Dirceu Teixeira de Oliveira, que sempre, com otimismo e realidade, ajudaram-me a conduzir e conciliar as responsabilidades sob as adversidades naturais de uma tese de doutorado, sem perder o valor humano, sem perder o ânimo, sem perder o prazo.

Finalizo agradecendo às minhas filhas Heloísa e Laís, pelo amor que pude receber desde o nascimento de cada uma delas, e que neste momento, reforçava a minha perseverança, quando esta parecia não existir mais.

Lista de Abreviaturas

γ_c	cadeia gama comum
AANP	autoanticorpos não pancreáticos
AAP	autoanticorpos pancreáticos
AIRE	gene supressor auto-imune
anti-21OH	anticorpo anti-enzima 21 Hidroxilase
anti-endom	anticorpo anti-endomísio
anti-GAD	anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65
anti-IA_2	anticorpo anti-tirosina fosfatase
anti-LKM1	anticorpo anti-microssomal de fígado e rim
anti-TG	anticorpo anti-tireoglobulina
anti-TPO	anticorpo anti-peroxidase
anti-transglut	anticorpo anti-transglutaminase recombinante
APC	células apresentadoras de antígeno
CD	células dendríticas
DA	doença de Addison

DC	doença celíaca
DP	desvio-padrão
DTAI	doença tireoideana auto-imune
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FAN	fator anti-nuclear
FR	fator reumatóide
HbA1c	hemoglobina glicada
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HLA–DR*	alelos DR do sistema HLA
HPLC	Cromatografia Líquida de alta Eficiência
I^{125}	Iodo marcado^{125}
IAA	anticorpo anti-insulina
ICA	antígenos citoplasmáticos não específicos das ilhotas de Langerhans
Idd3	*locus* 3 de suscetibilidade para diabetes autoimune em camundongos
IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina
IgE	Imunoglobulina classe E

IgG	imunoglobulina classe G
IgM	imunoglobulina classe M
IPEX	*Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome*
JAK1	enzima Janus Cinase 1
JAK3	enzima Janus Cinase 3
LADA	Diabetes latente auto-imune do adulto
Lady	Diabetes auto-imune latente do jovem
LYP	*Lymphoid Tyrosine Phosphatase*
MHC	Principal Complexo de Histocompatibilidade
MHC I	Principal Complexo de Histocompatibilidade classe 1
MHC II	Principal Complexo de Histocompatibilidade classe 2
MODY	*Maturity onset diabetes of young*
NFAT	fator de ativação nuclear de CT
NK	*Natural killers*
PCR	reação de polimerização em cadeia
Pep C	Peptídeo C
SNP	*single nucleotid polimorfism*
SPA	Síndromes Poliendócrinas Auto-imunes

SPA 2	*Autoimmune Polyendocrine Syndrome 2*
SPA1	*Autoimmune Polyendocrine Syndrome 1*
STAT1	ativador da transcrição 1
STAT3	ativador da transcrição 3
T CD4+	linfócito T CD4 ativado
T CD8+	linfócito T CD8 ativado
TCR	receptor de células T
Th	linfócito T auxiliar
Th1	linfócito T auxiliar1
Th2	linfócito T auxiliar2
TRAB	anticorpo anti-receptor do TSH
VNTR	números variáveis de repetições consecutivas da região do gene da insulina

Lista de Figuras

Figura 1. Interação da Interleucina-21(IL-21) e linfóciots B, T e *natural killer* (NK), após a apresentação do antígeno pela célula apresentadora de antígeno (APC) ao linfócito T CD4 ativado (CD4+). LT CD8 (Linfócito CD8). 36

Figura 2. Complexo do receptor da Interleucina 21(IL-21); IL-21R = receptor da IL-21; γ_c=cadeia gama comum; JAK 1e3 =Enzima janus cinase 1e3; STAT1= ativador de transcrição 1; STAT3= ativador de transcrição 3. 37

Figura 3. Diferenciação celular do Linfócito T *naïve*. STAT 1,3 e 4= ativadores de transcrição 1,3 e 4; Foxp3= fator de transcrição Foxp3; T-bet= fator de trnscrição T-bet ; GATA3= fator de transcrição GATA 3 ; RORγt=fator de transcrição ROR gama t ; TGF-β= fator de crescimento beta ; INF-γ= interferon gama ; Treg= células T reguladoras; Th1= linfócito T auxiliar 1;Th2= linfócito T auxiliar 2. 38

Figura 4. Mecanismo de ação do gene PTPN22: ativação celular através da proteína codificada Lyp R620; não ativação no polimorfismo 1858T do gene com proteína codificada Lyp W620. 43

Figura 5. Região 5' proximal do gene da IL-21. 67

Figura 6. Variante alélica encontrada na região 5' proximal do gene da IL-21 na posição -241 T>A, em paciente portadora de DM1A. 77

Lista de Tabelas

Tabela1. Freqüência em porcentagem do C1858T do gene PTPN22 em diferentes regiões, em diabéticos e controles normais. 44

Tabela 2. Avaliação dos grupos: diabéticos (DM1A) e controles normais. DP: desvio-padrão. n= espaço amostral. 74

Tabela 3. Avaliação da idade de diagnóstico, duração da doença e glicemia atual nos pacientes diabéticos (DM1A). 75

Tabela 4. Comparação do grupo controle e diabéticos (DM1A), quanto à cor da pele: B= branca; P= parda; N= negra; A= amarela, e ao gênero: F= feminino e M= masculino. 75

Tabela 5. Freqüência do polimorfismo C1858T do gene PTPN22, CC alelo selvagem e CT alelo heterozigoto e TT alelo homozigoto do polimorfismo, em pacientes diabéticos (DM1A) e grupo controle (GC). 77

Tabela 6. Freqüência dos genótipos CC, CT/TT do polimorfismo C1858T do gene do PTPN22 quanto ao gênero e cor da pele. 77

Tabela 7. Freqüência dos autoanticorpos anti-GAD65 e anti-tireoglobulina (anti-TG) nos genótipos selvagem (CC) e polimórficos (CT/TT) do gene PTPN22 em diabéticos (DM1A) e controle normal (GC). 78

Tabela 8. Avaliação dos genótipos CC e CT/TT do polimorfismo C1858T do gene PTPN22 quanto às características clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos. 79

Tabela 9. Freqüência dos alelos HLA-DRB1 nos diabéticos (DM1A) e grupo controle. 82

Lista de símbolos

A	Alfa
B	Beta
Γ	Gama
=	Igual
%	Percentagem
℃	grau Celsius
±	mais ou menos
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
μL	Microlitro
Ml	Mililitro
Ng	Nanograma
ng/μL	nanograma por microlitro
ng/mL	nanograma por mililitro
U/μL	unidade por microlitro
U/Ml	unidade por mililitro
mg/Dl	miligrama por decilitro
M	Molar
Mm	Milimolar
PM	Picomolar
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
Na	Sódio
KDa	Kilodanton

SUMÁRIO

Dedicatoria

Agradecimentos

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO 24

1. História natural do diabetes auto-imune 26

2. Diagnóstico 27

3. Autoimunidade e suscetibilidade genética no DM1A 31

3.1 Autoimunidade 31

3.1.1 Interleucina-21 35

3.2 Suscetibilidade genética 41

3.2.1 Gene PTPN22 43

4. Autoanticorpos: DM1A e outras doenças auto-imunes 46

4.1 Síndromes Poliendócrinas Autoimunes (SPA) 46

4.1.1 IPEX 47

4.1.2 APS1 47

4.1.3 SPA 2 48

5. Doenças autoimunes órgão-específicas associadas ao DM1A 49

5.1 Doença autoimune tireoideana (DAT) 50

5.2 Doença Celíaca 51

5.3 Doença de Addison 52

5.4 Insuficiência ovariana autoimune 53

5.5 Anemia perniciosa 54

6. Outras doenças autoimunes podem cursar paralelas ao DM1A, e podem ser identificadas pelos seguintes autoanticorpos: 55

6.1 Fator reumatóide (FR) 55

6.2 Fator anti-nuclear (FAN) 55

6.3 Anti-músculo liso 57

6.4 Anti-microssomal de fígado e rim (anti-LKM-1) 57

PACIENTES E METODOS 59

1. Condições éticas 60

2. Casuística: 60

2.1 Pacientes 60

2.2 Grupo Controle (GC) 61

3. Métodos 61

3.1 Marcadores imunológicos 61

3.1.1 Auto-anticorpos pancreáticos 63

3.1.2 Auto-anticorpos não-pancreáticos 64

3.2 Marcadores genéticos 66

3.2.1 Região 5' proximal da IL21 (-448pb +83pb) 66

3.2.2 Genotipagem do polimorfismo C1858T do gene PTPN22 69

3.2.3 Genotipagem do Sistema HLA-DR 70

3.3 Outras determinações 71

3.3.1 Glicemia 71

3.3.2 Hemoglobina glicada 71

3.3.3 Peptídeo C 71

3.4 Análise Estatística 72

RESULTADOS 73

1. Caracterização da população estudada 74

2. Seqüenciamento da região 5' proximal da IL-21

3. Polimorfismo C1858T do gene PTPN22 75

3.1 Frequência dos genótipos CC, CT e TT do polimorfismo C1858T do gene PTPN22 76

3.2 Freqüência do polimorfismo C1858T PTPN22 relacionado ao gênero e raça 76

3.3 Polimorfismo C1858T do gene PTPN22 e autoanticorpos 77

3.4 Polimorfismo C1858T do gene PTPN22 e características clínicas e laboratoriais de pacientes com DM1A 78

4. Autoanticorpos pancreáticos e não pancreáticos 78

4.1 Autoanticorpos pancreáticos (AAP) 79

4.2 Autoanticorpos não-pancreáticos (AANP): 79

5. Freqüência dos alelos HLA-DRB1 nos diabéticos e grupo controle 80

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO 81

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 90

ANEXOS 104

RESUMO

RESUMO

Mainardi-Novo D.T.O. ***Estudo da região promotora do gene da IL-21 (IL-21) e do polimorfismo do gene tirosina fosfatase, tipo não-receptor 22 (PTPN22): associação com autoanticorpos em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1A.*** **(Dissertação). São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011**

Resumo: As citocinas têm papel importante como mediadores através das respostas imunológicas. A Interleucina-21, importante regulador dos linfócitos T e B, é produzida por linfócitos CD4 ativados, e está implicada na patogênese do diabetes autoimune em modelo animal, o NOD. A região promotora da IL-21, que contempla sítios de controle da expressão gênica em camundongos, o NFATc2, T-bet e c-MAF, foi estudada pela primeira vez em humanos portadores de diabetes tipo 1A, neste trabalho. Foi analisado também a freqüência do polimorfismo C1858T do gene PTPN22, que tem sido associado em estudos recentes como fator de risco importante para diabetes tipo1A e outras doenças autoimunes. Associou-se ainda, autoanticorpos pancreáticos e não-pancreáticos em diabéticos e grupo controle normal, e estes resultados foram analisados com ambos os genes. Foram estudados 612 DM1A e 792 indivíduos do grupo controle. Após extração de DNA genômico, a região 5'proximal da região promotora do gene da Il-21, -448+83pb, foi seqüenciada em 309 brasileiros diabéticos tipo 1A e 189 indivíduos do grupo controle. A genotipagem do polimorfismo C1858T do gene PTPN22, por RFLP, foi realizada em 434 diabéticos e 689 controles, bem como os alelos HLA-DRB1. Foi encontrada uma variação alélica, em heterozigoze, na posição g.-241 T>A, em apenas uma paciente, que apresentou idade de diagnóstico aos 30 anos de idade. Esta variante alélica não foi encontrada nos 497 indivíduos (308 DM1A e 189 grupo controle). A freqüência dos alelos polimórficos (CT/TT) foi maior nos diabéticos (18.7%) que no grupo controle (10.6%), OR 1,94 e p<0,001. O polimorfismo C1858T do gene PTPN22 associou-se à maior freqüência dos autoanticorpos pancreático anti-GAD65 (p=0,002) e não-pancreático anti-TG (p=0,001), quando avaliados os dois grupos juntos, DM1A e grupo controle. Os diabéticos apresentaram maior freüência dos autoanticorpos como segue: autoanticorpos pancreáticos: anti-GAD65: 225 /482 (46.7%) vs 13/786 (1.7%), p<0.001; anti-IA_2 : 204/469 (43.5%) vs 15/786 (1.9%),

p<0.001. Autoanticorpos não-pancreáticos: FAN: 60/234 (25.6%) vs 13/239 (5.4%), p<0.001; anti-TPO: 64/279 (22.9%) vs 34/495 (6.9%), p<0.001; anti-TG : 65/278 (23.4%) vs 44/489 (9%), p<0.001; TRAb: 14/187 (7.5%) vs 1/327 (0.3%), p<0.001; anti-21-OH : 8/154 (5,2%) vs 1/160 (0,6%), p< 0,001. Os autoanticorpos a seguir foram realizados apenas nos pacientes diabéticos: anti-tTG 5/73% (6.8%), anti-Endom 10/176 (5.7%). Com exceção do anti-GAD65 e anti-TG, nenhum outro autoanticorpo associou-se ao polimorfismo do gene PTPN22. Os alelos HLA-DR3/DR$ predominaram nos diabéticos (p<0,001). Concluimos então que o polimorfismo C1858T do gene PTPN22 e os alelos HLA-DR3/DR4 estão associados ao risco de DM1A. Variantes alélicas na região 5' proximal do gene da IL-21 parece não ser predisponente à suscetibilidade ao DM1A e outras doenças autoimunes. Autoanticorpos órgão-específicos são mais freqüentes em diabéticos, principalmente nas glândulas adrenal e tireóide. O polimorfismo C1858T do gene PTPN22 está associado à maior freqüência dos autoanticorpos anti-GAD65 e anti-tireoglobulina.

Descritores: Diabetes mellitus tipo 1, Auto-imunidade, Interleucina-21, Citocinas, Polimorfismo genético, Auto-anticorpos, Doenças auto-imunes.

SUMMARY

SUMMARY

Allelic variant in IL21 promoter region, C1858T PTPN22 frequency and autoantibodies in Brazilian type 1A diabetes patients.

Abstract

Objective: Cytokines are central mediators of inflammation through innate and adaptive immune responses. IL-21, a critical regulator of T and B cell function, is produced by various subsets of CD4+ T cells, and it has been implicated in the pathogenesis of non obese diabetes mouse. The proximal promoter of IL-21, which controls its Th-cell-subset-specific expression through the action of NFATc2, T-bet and c-MAF in animal models, was evaluated in type 1A diabetes (T1AD) patients for the first time. This study also analyzed the 1858T PTPN22 polymorphism, which has recently emerged as an important risk factor for T1AD and other autoimmune diseases. Moreover, islet and other organ-specific autoantibodies were quantified in T1AD patients and healthy controls and the results were correlated with both genes. **Research design and methods:** The case series comprised 612 T1AD patients and 792 healthy control (HC) individuals. Genomic DNA extraction was performed by salting-out in purified blood leukocytes. The region encompassing -448+83 bp of IL-21 gene was amplified and sequenced using genomic DNA from 309 Brazilian T1AD patients and 189 control individuals. RFLP genotyping of C1858T PTPN22 was performed in 689 controls and 434 T1D patients. HLA DR3/DR4 alleles were also evaluated. **Results:** A heterozygous allelic variant (g.-241 T>A) was found in only one patient, who was 30 years old at the onset of disease. This allelic variant was not found in 497 individuals (308 T1AD patients and 189 healthy controls). The PTPN22 1858T allele frequency was greater in patients (18.7%) than in controls (10.6%): odds ratio of 1.94; $p<0.001$. An association was found between C1858T polymorphism and higher frequency of GAD65 Ab ($p=0.002$) and TG Ab ($p=0.011$), among both T1AD and HC. Type 1 diabetes patients presented higher frequency of the following autoantibodies, compared with HC ($p<0.001$): GAD65 Ab (46.7% vs 1.7%); IA_2 Ab (43.5% vs 1.9%); ANA (25.6% vs 5.4%); TPO Ab (22.9% vs 6.9%); TG Ab (23.4% vs 9.0%); TRAb (7.5% vs 0.3%); 21-OH Ab (5,2%

vs 0,6%). The following antibodies were evaluated only in T1AD: tTG Ab (6.8%) anti-Endom (5.7%). Except by GAD65 Ab and TG Ab, no association was found between C1858T polymorphism and these autoantibodies.HLA-DR3/DR4 alleles predominated in T1D patients ($p<0.001$) **Conclusions:** C1858T PTPN22 polymorphism and the HLA-DR3 and/or DR4 alleles were associated with proneness to T1AD. Allelic variants at the 5' proximal region of the IL-21 gene do not seem to predispose to susceptibility to T1AD and other autoimmune endocrine diseases. Autoantibodies specific to other organs and tissues are frequent in T1AD carriers, mainly to the thyroid glands. The 1858T PTPN22 polymorphism was associated with higher frequency of GAD65A and TGA.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Diabetes melito autoimune ou diabetes melito tipo1A (DM1A) é uma doença crônica, que cursa com a destruição auto-imune das células-beta pancreáticas produtoras de insulina, resultando na deficiência desse hormônio e hiperglicemia sintomática (1,3). A ADA (*American Diabetes Association*) propôs a classificação etiológica do Diabetes tipo 1, sendo o diabetes tipo1A (DM1A), o que representa o diabetes imuno-mediado, e o diabetes tipo1B (DM1B), o diabetes idiopático, não auto-imune (2). No DM1A, a destruição pancreática é variável e progressiva, resultando na necessidade precoce e permanente do tratamento com insulina exógena e com o risco de cetoacidose (3).

O DM1A é mais comum na raça branca e sua incidência é variável entre populações e áreas geográficas. Compreende 90% dos casos de diabetes na infância e sua prevalência é de 0,3-0,4% da população caucasiana nos Estados Unidos da América (5-6). A Finlândia e a Sardenha apresentam as maiores taxas de incidência mundial (superiores 35/100.000/ano), enquanto as menores taxas são encontradas na maioria dos países da América do Sul e nos países asiáticos (inferiores a 5/100.000/ano). No Brasil, é de 8/100.000/ano (4).

O melhor marcador para diferenciar o DM1A dos outros tipos de diabetes é a presença de auto-anticorpos anti-antígenos pancreáticos: anti-

descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD), anti-insulina (IAA) e anti-tirosina fosfatase 2 (anti-IA_2) (3,6,16,29,81).

1. História natural do diabetes auto-imune

A história natural da DM1A compreende uma complexa interação entre fatores ambientais, imunológicos e genéticos. Vários fatores etiológicos estão implicados como desencadeantes da auto-imunidade(60,62,66,75).

- Fatores ambientais: vírus Coxsackie B e da rubéola, toxinas, reduzido número de infecções (teoria da higiene), deficiência na suplementação da vitamina D e alguns alimentos como a introdução precoce do leite de vaca, e tardia e abrupta de cereais (4,66).
- Fatores imunológicos: na doença auto-imune ocorre falha da tolerância imunológica, isto é, falha no reconhecimento do próprio (*self)* pelo sistema imunológico, e subseqüente reatividade imune contra auto-antígenos (antígenos próprios)(40,43,62,63). Essa reativação celular colabora para o desequilíbrio da homeostase e da resposta do sistema imunológico. No DM1A, há um infiltrado inflamatório no pâncreas, particularmente nas ilhotas, composto por linfócitos B e T, células dendríticas e macrófagos, bem como auto-anticorpos circulantes contra auto-antígenos específicos pancreáticos, configurando então, a participação tanto da imunidade celular como da humoral (31-33,39).
- Fatores genéticos: a região cromossômica do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (6), localizada no cromossomo 6, constitui o principal locus de suscetibilidade

para DM1A, denominado IDDM1, conferindo suscetibilidade genética de aproximadamente 50%. No locus HLA-DR, os alelos-DR*3 e/ou -DR*4 são os mais freqüentes nos pacientes diabéticos (95% *versus* 50% dos controles caucasianos) (37,41,60,67).

A seguir está a região do VNTR (números variáveis de repetições consecutivas) do gene da insulina (70), e outros genes como o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA4)(7) e a proteína tirosina fosfatase não receptor tipo22 (PTPN22) (8,52,54,59,65). Vários outros genes, que não estão na região do HLA, estão sendo estudados quanto à sua participação na resposta imune no DM1A (1-2, 4,9,13,56,60,67).

Outras doenças auto-imunes estão relacionadas ao DM1A como a doença tireoideana auto-imune (DTAI), a doença celíaca (DC), a doença de Addison (DA) e as Síndromes Poliendócrinas Auto-imunes (SPA): Síndrome Poliendócrina Autoimune 1 (SPA1), Síndrome Poliendócrina Autoimune *2* (SPA 2) e Síndrome da Imuno desregulação Poliendócrina ligada ao X (IPEX) (23, 24, 26,29,75).

2. Diagnóstico

Um dos clássicos componentes das doenças autoimunes é a presença de autoanticorpos e os marcadores mais utilizados no diagnóstico da DM1A são os autoanticorpos contra antígenos da célula beta pancreática (3-4,13,15-17,26,29,81). A metodologia para a determinação dos auto-anticorpos é de fácil realização e reprodutibilidade, e auxilia no diagnóstico precoce e prevenção de

episódios de cetoacidose em familiares de diabéticos, embora esta não seja uma indicação usual (4). Outra importante indicação desses auto-anticorpos é a identificação dos portadores do diabetes latente auto-imune que ocorre no adulto (LADA) (3-4,13).

No entanto, nem todos auto-anticorpos detectados em seres humanos implicam em doença. Os auto-anticorpos denominados naturais podem apresentar-se em baixa concentração sérica em todos os seres humanos, costumam ser mais freqüentes em idosos e são considerados anormais somente em concentrações elevadas. Normalmente, estes auto-anticorpos não são órgãos-específicos. Já os auto-anticorpos órgãos-específicos reagem somente com componentes do órgão em questão, conferindo especificidade (16).

Assim, a detecção sérica de auto-anticorpos específicos, freqüentemente presentes no sangue anos antes da manifestação clínica da doença, é uma importante ferramenta para o diagnóstico de doenças auto-imunes. A acurácia diagnóstica é ainda muito variável, dependendo do tipo de doença autoimune e dos diferentes sistemas auto-antígeno/auto-anticorpo implicados. Por outro lado, a positividade do auto-anticorpo pode ser transitória e até desaparecer, sem que nunca se manifeste a doença clínica. Portanto, é importante considerar que a positividade do autoanticorpo não necessariamente configura o diagnóstico da doença autoimune e que, é de importância crucial saber como tratar esses pacientes que apresentam positividade “inesperada” de auto-anticorpo, cuja freqüência apresenta expectativa de crescimento, frente à

evolução dos métodos de detecção dos auto-anticorpos, incluindo os *microarrays* (23).

O diagnóstico diferencial do DM1A, freqüente na infância e adolescência, é fundamental, já que outros tipos de diabetes implicam muitas vezes em tratamentos diferentes. Pode ser dividido em Diabetes Melito (DM) com auto-anticorpos pancreáticos positivos e negativos.

DM com auto-anticorpos positivos compreende:

O *LADY (Diabetes auto-imune latente do jovem),* ou *diabetes tipo 1,5,* ou *diabetes duplo DD* ou também chamado *diabetes híbrido*. Essa nova forma de diabetes foi caracterizada há mais de uma década, por autores alemães e, recentemente, por pesquisadores americanos. Um número crescente de crianças e adolescentes vêm apresentando a mistura dos dois tipos principais de diabetes, isto é, indivíduos obesos e/ou com sinais de resistência à insulina associados à presença de marcadores de autoimunidade contra as células-beta. (22).

LADA–Diabetes Auto-imune Latente do Adulto apresenta suscetibilidade genética semelhante à do DM1A, principalmente para os alelos HLA-DR3/DR4, e manifestação clínica-diagnóstica mais tardia. Geralmente o diagnóstico é feito após os 35 anos de idade e o período prodrômico é longo e assintomático. Sintomas agudos, com cetonúria ao diagnóstico, são raros. Pode ocorrer preservação da função residual das células-beta, evoluindo lentamente para a falência total dessas células e conseqüente dependência de insulina exógena em até 5 anos após o diagnóstico, mimetizando então o curso clínico do diabetes tipo 2 (DM2). O diagnóstico é confirmado pela

presença de auto-anticorpos pancreáticos, principalmente o anti-GAD, positivo em 80% dos casos, na ocasião do diagnóstico (3-4,13).

DM com auto-anticorpos negativos:

MODY (*Maturity onset diabetes of young*) é definido como um tipo de diabetes familiar, de diagnóstico precoce, podendo ocorrer durante a infância, adolescência ou ainda na fase adulta jovem. Sua transmissão genética é autossômica dominante e associa-se a defeitos na secreção de insulina. Devido às mutações nos genes MODY terem alta penetrância, 95% dos indivíduos que apresentarem mutação MODY serão diabéticos ou apresentarão alterações glicêmicas até os 55 anos de idade. A suspeita clínica deve ser conduzida, primeiramente, considerando-se os antecedentes familiares (três gerações acometidas) e, em segundo plano, a idade do diagnóstico. Ocorre mais em pacientes magros, contrastando com crianças e adolescentes portadores de DM2. Existem seis subtipos de MODY, com seis genes diferentes envolvidos na codificação da enzima glicoquinase ou fatores de transcrição expressos nas células beta-pancreáticas (2,32-34). Muitos portadores de MODY não requerem a insulinoterapia.

O Diabetes Mitocondrial é uma doença rara, 0,5-2,6% dos casos de diabetes, associada à surdez. Alterações no DNA mitocondrial têm sido implicadas no desenvolvimento de diabetes mellitus, sendo a substituição das bases A por G na posição 3243 no gene, a mutação mais comumente associada. A segregação dessa mutação com diabetes foi inicialmente reportada por van den Ouweland e col (74) e, em 1992, em uma grande família holandesa, sendo posteriormente proposto o nome de MIDD (*Maternal Inherited Diabetes and Deafness*) para esse subtipo de diabetes. Nesses

pacientes, a dependência da insulina pode ser precoce ou tardia. A suspeita clínica é feita pela presença de perda auditiva neuro-sensorial, transmissão materna do diabetes, índice de massa corporal normal ou baixo e baixa estatura (19).

Diabetes neonatal decorre de alterações no receptor de sulfoniluréia (SUR). Apesar de neonatal corresponder ao período do nascimento até o 28º dia de vida, o diabetes neonatal (DN) tem sido definido na literatura como a presença de hiperglicemia que necessita de tratamento com insulina nos três primeiros meses de vida. Após os 6 meses de idade, o diabetes melito tipo 1 auto-imune representa a causa mais comum da doença (20).

DM1 idiopático é caracterizado pela ausência, tanto de insulite, como dos anticorpos relacionados ao diabetes auto-imune, e cursa com períodos de cetoacidose e graus variados de deficiência de insulina entre estes períodos. Predomina em descendentes de africanos e asiáticos.

3. Autoimunidade e suscetibilidade genética no DM1A

3.1 Autoimunidade

A condição fisiológica de equilíbrio do sistema imunológico é denominada de homeostase do sistema imune (30-33,68). Esta é responsável pela manutenção do número constante de células desse sistema, através de diversas vias controladas de morte e ativação celular(43,68-69).

Outro aspecto fundamental para uma condição normal do sistema imune é a autotolerância imunológica, caracterizada pela ausência de resposta imunológica de adaptação aos auto-antígenos(30-33,43,68-69).

A tolerância imunológica é denominada de tolerância imunológica central, quando ocorre nos órgãos linfóides primários, timo e medula, onde as células progenitoras potencialmente auto-reativas são eliminadas, por seleção negativa, antes de atingirem a circulação periférica. E, para sanar possíveis imprecisões desse controle central aos auto-antígenos, ocorrem mecanismos adicionais de controle da autorreatividade na periferia, denominada tolerância imunológica periférica (16, 29, 30-33,43,68-69).

Já na autoimunidade ocorre um estado de sensibilidade do sistema imunológico adaptativo aos antígenos próprios, por falha dos mecanismos de auto-tolerância, levando à auto-reatividade celular, produção excessiva de auto-anticorpos e lesões teciduais (16, 29,31,).

Entre os auto-anticorpos mais estudados no DM1A encontram-se aqueles dirigidos à enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65, à própria insulina, ao fragmento intracelular da molécula homóloga à proteína da família das tirosino-fosfatase e aos antígenos citoplasmáticos não específicos encontrados nas ilhotas de Langerhans (4,13,15,81). Estes auto-anticorpos estão presentes na maioria dos diabéticos recém-diagnosticados, variando em relação à magnitude dos seus níveis séricos, sua freqüência e a associação entre eles no decorrer da doença (16,36-37).

A velocidade de destruição das células beta pancreáticas está relacionada à quantidade, tipo e títulos de autoanticorpos positivos e a determinados marcadores genéticos (4,5,13,15,35,60,75,87-89). Pacientes com

DM1A também apresentam freqüência aumentada de outras doenças autoimunes como: tireoidite, adrenalite, doença celíaca, ooforite, anemia perniciosa (11-12,14-15,17,23-26,29,32,75,90-93).

Um conceito recente a respeito de autoimunidade aponta para as situações de linfopenia como provável fator predisponente (6). A homeostase do sistema imunológico, situação equilibrada, porém dinâmica, resulta da interação constante da produção de novos linfócitos nos órgãos linfóides primários, e da expansão da população de linfócitos, que pode ocorrer durante as respostas aos antígenos imunogênicos, *versus* a apoptose e a inativação celular, mantendo, assim, um número equilibrado dessas células durante toda a vida (30-33).

Em situações de repouso, onde não há resposta imunológica frente a um antígeno específico, a população periférica de leucócitos é mantida constante através da proliferação basal (ou espontânea), que é mínima, apenas para manutenção da população celular. Já a proliferação homeostática é induzida quando ocorre linfopenia, que pode ser causada por infecção bacteriana, viral, radiação, quimioterapia ou extremos de idade como nas crianças e nos idosos, situações estas relacionadas à involução tímica. (30-33,36).

A expansão celular do sistema imune é regulada pela interação das células T entre si (que agem como sensores, reduzindo a proliferação quando há excesso de células periféricas) e pela competição por suprimentos limitados. O mecanismo da expansão das células T sofre influência da competição por acesso a ligantes estimulatórios, incluindo citocinas e complexo peptídeo-MHC (30-33). As células T necessitam dessa interação

peptídeo e sistema MHC para expandir em situações de linfopenia, e tal expansão pode ocasionar a proliferação excessiva de clones de células T auto-reativas, que estariam normalmente tamponados (30-33).

A elevada afinidade por auto-ligantes parece ser vantajosa para as células autorreativas, pois a ligação com o antígeno é fator importante na expansão celular do sistema imune. Situações de linfopenia estimulam a competição pelos peptídeos antigênicos e favorecem a expansão das células T auto-reativas, sugerindo que a linfopenia seja uma condição de indução da auto-imunidade. Parece, inclusive, permitir a auto-imunidade de forma mais importante que o próprio evento causal da linfopenia (42). A linfopenia foi identificada em casos de DM1A, lupus eritematoso sistêmico (LES), síndrome de Sjörgen, auto-imunidade precipitada por infecção viral e em pacientes timectomizados por *miastenia gravis* que evoluem para LES. Nestes casos, o repertório de células T é restrito. Verificou-se que a linfopenia, bem como a ativação e aumento da formação de células T de memória, ocorrem na evolução do Diabetes Mellitus tipo 1A. (43).

Além da interação antígeno-MHC, outros fatores que atuam na homeostase das células T são as citocinas (44), que são mediadoras da inflamação, controlando tanto a resposta imune inata como a adaptativa (73).

As citocinas do tipo I, membros da família gama comum, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, atuam na homeostase das células T e são definidas por seus receptores, que contém a cadeia gama comum (γ_c). Essa cadeia é um componente do receptor para a transdução de sinais e também medeia os efeitos homeostáticos das citocinas. Estas citocinas estão envolvidas no crescimento e sobrevida das células T e atuam na expansão ou restrição do

repertório celular do sistema imune. Participam, desta forma, da homeostase desse sistema e estão relacionadas à auto-imunidade. As células que possuem alta afinidade pelo próprio expandem, sob a influência destas citocinas (44).

3.1.1 Interleucina-21

A Interleucina-21 (IL-21) foi recentemente descrita e faz parte da família das citocinas tipo I, cujos receptores têm a cadeia gama comum (γ_c). Produzida por vários subconjuntos do Linfócito T CD4 +, interfere na resposta imunológica (44,46,47), com importante papel regulador dos linfócitos T e B (46-49). A IL-21 tem sido implicada na patogênese da diabetes tipo 1 e no modelo animal de diabetes autoimune, o camundongo diabético não obeso (NOD) (64,76).

O receptor da cadeia gama comum (γ_c) encontra-se mutado na imunodeficiência grave combinada ligada ao X (XSCID), uma doença com importante comprometimento da função das células T e NK, bem como diminuição da função das células B (46).

A IL-21, produzida pelas células T CD4+ ativadas, tem capacidade de aumentar a proliferação de células T, coordenar a diferenciação de células B e aumentar a atividade citotóxica de células NK, podendo estar relacionada ao desenvolvimento da autoimunidade. Apresenta ainda efeito autócrino na proliferação de celulas T CD4+ e CD8+, o que parece aumentar a resposta auxiliar Th1 e a atividade do linfócito T citotóxico (45). Fig 1.

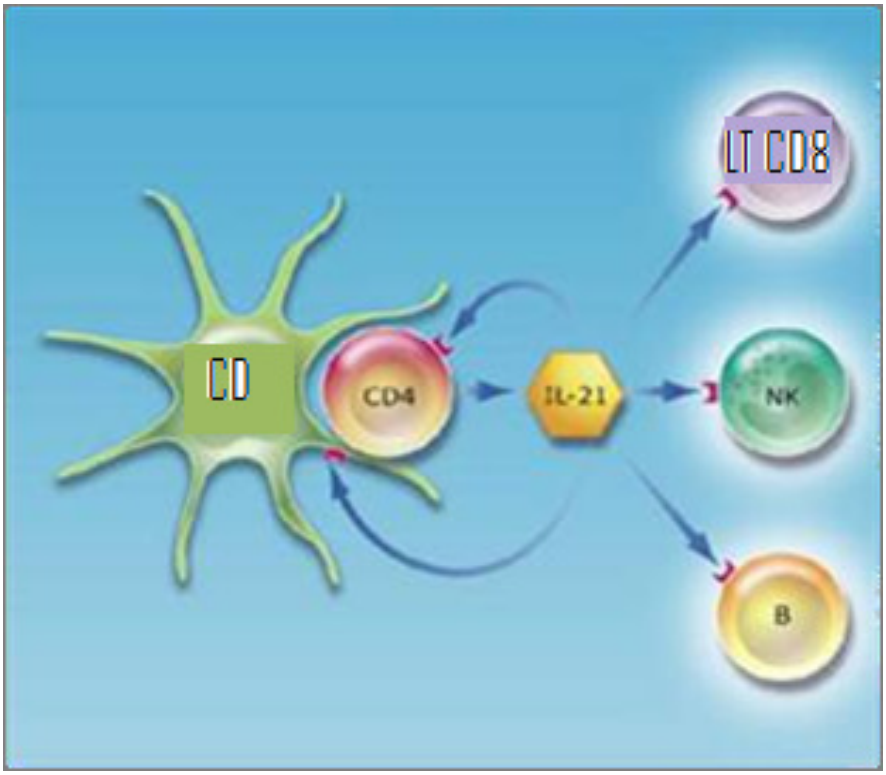

Figura 1. Interação da Interleucina-21(IL-21) e linfóciots B, T e *natural killer* (NK), após a apresentação do antígeno pela célula apresentadora de antígeno (APC) ao linfócito T CD4 ativado (CD4+). LT CD8 (Linfócito CD8).

A IL-21 é codificada pelo gene da IL-21, que está localizado no cromossomo 4q26-q27. O receptor da interleucina 21 (IL-21R), descoberto em 2000, é composto de uma sub-unidade de receptor e a cadeia gama comum (45). É expresso em tecidos linfóides como o timo, baço e em células B, T, NK e células dendríticas tanto em repouso como ativadas. Tal distribuição indica a participação da IL-21 na sinalização do sistema imune (44). O gene que codifica o receptor da IL-21 está localizado no cromossomo 16. Sua ativação pela interleucina-21 ativa as enzimas Janus Cinases, JAK1 e JAK3, sendo que a JAK1 liga-se à sub-unidade do receptor da IL-21 e a JAK3 à cadeia gama comum, iniciando a transdução do sinal (47). Essas cinases, por sua vez, ativam transdutores de sinais e ativadores da transcrição 1 (STAT1) e 3

(STAT3) (45) Fig2 , induzindo a expressão de genes com padrão relacionado à resposta Th1 e a expressão de interferon-gama (IFN-gama).

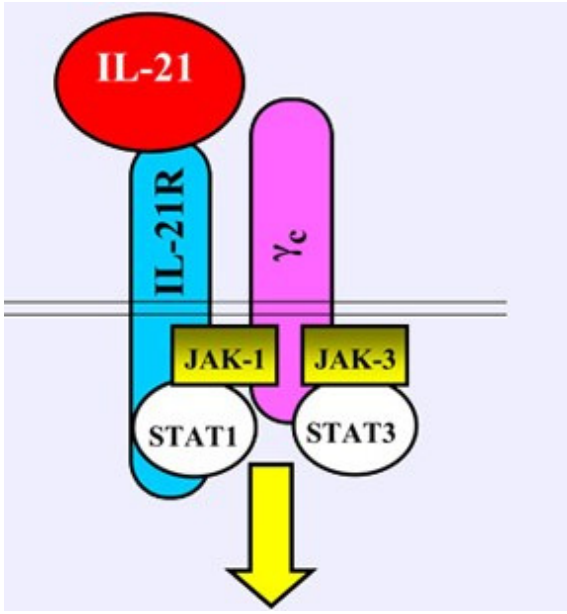

Figura 2. Complexo do receptor da Interleucina 21(IL-21); IL-21R = receptor da IL-21; g_c =cadeia gama comum; JAK 1e3 =Enzima janus cinase 1e3; STAT1= ativador de transcrição 1; STAT3= ativador de transcrição 3.

Interleucina-21 controla a diferenciação e atividade funcional de células efetoras T *helper*, neutraliza os efeitos supressores das células T reguladoras, e estimula as células não-imunes a produzir mediadores inflamatórios. A lesão tecidual dirigida pela IL-21 foi demonstrada em uma série de órgãos como o intestino, o pâncreas e o cérebro, sugerindo que novas modalidades de tratamento para neutralizar IL-21 *in vivo* seriam uma adição valiosa ao arsenal terapêutico para combater a inflamação imuno-mediada. (68).

Células T CD4+, após a ativação e expansão, diferenciam-se em subconjuntos de células T *helper*, com perfis de citocinas e funções efetoras

distintas. Até recentemente, as células T foram divididas em células Th1 ou Th2, dependendo das citocinas que produzem. Um terceiro subconjunto de células efetoras T *helper*, que produzem a IL-17, chamado de células Th17, foi recentemente descoberto e caracterizado. Células Th17 produzem IL-17, IL-17F, e IL-22, induzindo intensa inflamação dos tecidos devido à ampla distribuição dos seus receptores. Essas células também secretam IL-21, que interage com outras células do sistema imunológico, e, por ação autócrina, induz à produção de IL-17 e à expressão do seu fator de transcrição, RORγt via Stat3. A geração de células Th17 na forma convencional é atenuada pelo bloqueio de IL-21 (68-69). Figura 3.

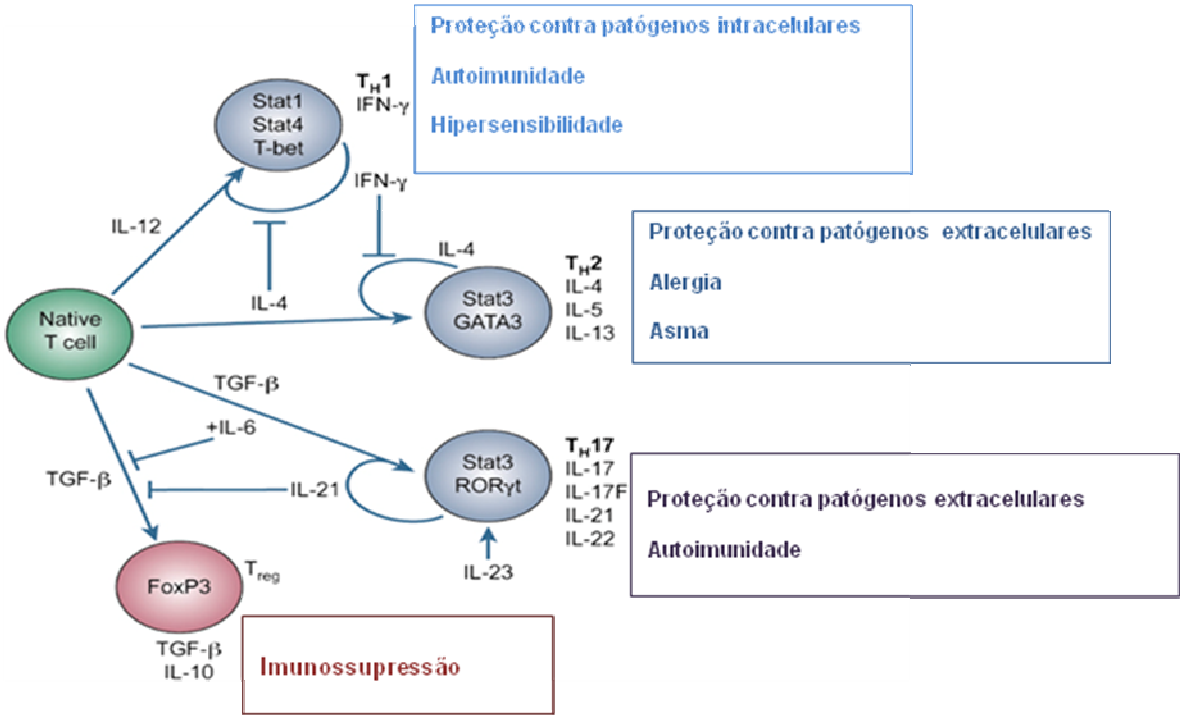

Figura 3. Diferenciação celular do Linfócito T *naïve*. STAT 1,3 e 4= ativadores de transcrição 1,3 e 4; Foxp3= fator de transcrição Foxp3; T-bet= fator de trnscrição T-bet ; GATA3= fator de transcrição GATA 3 ; RORγt=fator de transcrição ROR gama t ; TGF-β= fator de crescimento beta ; INF-γ= interferon gama ; Treg= células T reguladoras; Th1= linfócito T auxiliar 1;Th2= linfócito T auxiliar 2.

A quarta via de ativação linfocitária compreende as células T reguladoras (Treg), de fenótipo CD4+CD25+Foxp3+, que apresentam elevada expressão do ligante CD25 ($CD25^{high}$) e presença do fator de transcrição nuclear, o Foxp3. Estão relacionadas com a supressão celular (69) e exercem um papel importante na contenção de respostas autoimunes em modelos animais e em humanos. Citocinas específicas, dentre elas a IL-21, inibem a diferenciação, a manutenção e a sobrevivência das Tregs, e seus efeitos podem influenciar diretamente tanto no número quanto na atividade funcional destas células em doenças auto-imunes (67)

A regulação da expressão do gene da IL-21 ocorre através do controle da região promotora pela ação do fator de transcrição NFATc2 (*nuclear factor of activated T cels*), T-bet (47) e c-MAF (76). NFATc2 está diretamente relacionado à ativação da transcrição da IL-21 em células Th2, e o T-bet, à inibição da transcrição da IL-21 em células Th1(48). Após a ativação de células T, a IL-21 é fortemente induzida em nível transcricional. Estudos, tanto em modelo animal quanto humano, evidenciam três sítios de ligação NFAT, indutores da atividade da região promotora da IL-21 que, quando mutados ou inibidos pela Ciclosporina A, reduzem essa função (47,64). Hiramatsu et al mostrou que o c-MAF, também importante para a produção de IL-21, é induzido por IL-6 e inibido pelo TGF-β(64,76).

No modelo animal de diabetes auto-imune, o camundongo NOD, que é linfopênico, a expansão de células T se correlaciona com grave inflamação da ilhota. Nesse modelo animal há super-expressão do receptor da IL-21 nas células T de memória, aumento dos níveis de RNA mensageiro da IL-21 e

aumento da resposta a esta citocina *in vivo* (33,46). A IL-21 confere instabilidade dentro da população de células T ao promover rápida proliferação celular, mas não sobrevida (33,47,76). Como estas células não recebem sinal de sobrevida, esta situação instável de linfopenia favorece a replicação descontrolada, levando à senescência replicativa e ao contínuo re-direcionamento do repertório das células T em direção aos antígenos próprios, gerados por efeito ambiental. Assim, o excesso de IL-21 parece dirigir um circuito ininterrupto que leva à auto-imunidade (33,47). Em células B, a IL-21 induz a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e a sua maturação e promove a produção de imunoglobulinas IgG, direcionando para classes de anticorpos IgG1 e IgG3, com a participação da IL4, e redução da IgE. A IL-21 é a mais importante citocina a participar na diferenciação das células T e plasmócitos (73,76).

Possui ainda efeitos pró-apoptóticos em células B inativas. Em células NK induz a diferenciação celular e sua maturação, ativa a sua atividade citotóxica, é indutora da atividade anti tumoral mas também tem efeito pró-apoptótico. Em células mielóides aumenta a proliferação e/ou diferenciação celular de linhagens de monócitos, macrófagos e granulócitos (49,61).

Há estudos propondo que, em animais com diabetes auto-imune, a IL-21 seja o gene candidato da região Idd3 e que a auto-imunidade seja iniciada pela linfopenia e a compensatória expansão homeostática de células T auto-reativas ativadas pela IL-21 (47). A IL-21 tem sua atividade aumentada em dois modelos animais: o camundongo NOD (DM1A) e rato BXSB.B6-Yaa+/J (LES). Estudos em humanos verificaram aumento da expressão do receptor da IL-21

em portadores de esclerose sistêmica (ES) (50) e artrite reumatóide (AR) (51). Esta hiper-expressão do receptor da IL-21 pode advir da maior expressão da IL-21 (47,76). No entanto, quando analisamos pacientes DM1A de início recente, duração do diabetes inferior a 6 meses, evidenciamos, em relação a controles normais, importante diminuição da expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum: da IL-21 e da IL-2 em linfócitos periféricos T CD3+ e CD4+ e da IL-4 e IL-7, em linfócitos T CD3+ e CD4+ respectivamente (71). Também a expressão do receptor da IL-17, principal interleucina da via Th17, estava diminuída em linfócitos T CD3+ e CD4+, sugerindo que a via Th17 não está ativada na fase inicial do DM1A (72). Por outro lado, houve redução significativa no número de células TCD4+CD25+^{high} (células T regulatórias) nestes pacientes, confirmando a importância da menor atividade desta via supressora na gênese da autoimunidade (61,71).

Desta forma, a análise da região promotora do gene da IL-21, citocina ativadora da via Th17, poderia auxiliar na compreensão destes resultados. Não há ainda avaliação em humanos portadores de diabetes.

Considerando os efeitos pleiotrópicos de IL-21 na regulação imune, a busca de alterações genéticas que impulsionam a sua função e regulação e que possam, através do processo autoimune, levar à destruição das células beta, são importantes.

3.2 Suscetibilidade genética

Quanto à susceptibilidade genética, foram descritos vários *loci*, estando os mais importantes localizados nos cromossomos 2, 6 e 11. Tanto em modelo

animal como em humanos, os maiores determinantes do DM1A são os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) – Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) (6). Estudos em caucasianos demonstraram associação dos alelos de classe II HLA-DR3 (DRB1*0301)-(DQA1*0501/DQB1*0201) e/ou HLA-DR4 (DRB1*0401,02,04)-(DQA1*0301/DQB1*0302). A proteção é condicionada aos alelos HLA-DRB1*15 e DRB1*11, que são considerados protetores para diabetes na maioria dos grupos étnicos (70).

O segundo maior *locus* de susceptibilidade para DM tipo 1A é o IDDM2, que se localiza no cromossomo 11p15 e confere risco de aproximadamente 10% para DM1A. A presença dos alelos de classe I da região VNTR do gene da insulina varia de 30-61% nos controles normais, enquanto que na população caucasiana diabética é geralmente superior a 60%, conferindo risco relativo de 1,9 a 3,5 (6,36-38,70). Estudos populacionais demonstram que alelos da classe III são dominantemente protetores e estão associados à redução de 60-70% no risco de desenvolvimento do DM tipo 1A (6,36-37,70).

Vários estudos têm demonstrado que outros genes atuantes na resposta imune também parecem contribuir para a susceptibilidade ao DM1A, como os relacionados à ativação das células apresentadoras de antígeno (APC), à expressão de moléculas co-estimuladoras e supressoras do linfócito T, à ação citotóxica do linfócito T e à produção de citocinas e auto-anticorpos (6,32,33). Entre eles está o gene PTPN22 (3-5,40-41,52-55,83).

3.2.1 Gene PTPN22

O gene da *Protein Tyrosine Phosphatase, non receptor 22* (PTPN22), localizado no cromossomo 1p13.3-p13.1, codifica a proteína tirosina fosfatase, que é expressa primariamente nos tecidos linfóides, também chamada *Lymphoid Tyrosine Phosphatase* (Lyp). Lyp é um dos mais potentes inibidores da ativação de células T, impede a sua ativação espontânea e restringe sua resposta a antígenos (41). Figura 4.

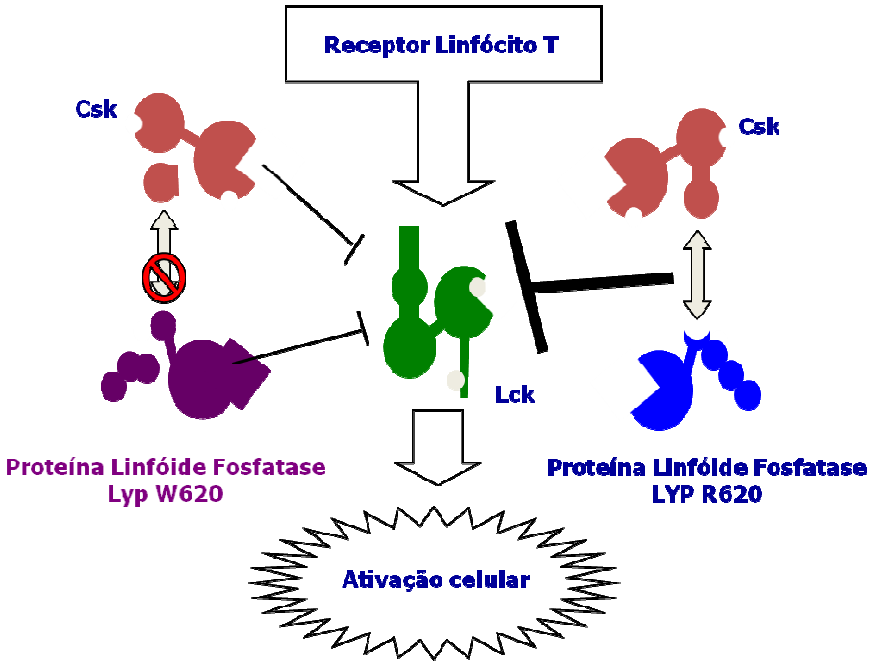

Figura 4. Mecanismo de ação do gene PTPN22: ativação celular através da proteína codificada Lyp R620; não ativação no polimorfismo 1858T do gene com proteína codificada Lyp W620.

Bottini e cols (41) mostraram, que o polimorfismo (SNP) C>T na posição 1858, que causa a substituição de uma arginina na posição 620 por um triptofano (R620W), favorece o diabetes (p<0,05) (41,52-54). Outros autores também observaram maior freqüência dos genótipos CT e TT nos diabéticos em relação aos controles, especificados na Tabela 1.

Freqüência C1858T	**Pacientes DM1A**		**Grupo controle normal**	
	n	**%**	**n**	**%**
Colorado EUA (41)	294	34,3	395	22,3
Geórgia EUA (52)	396	26,8	1178	16,5
Cambridge UK (53)	1573	31,5	1718	19,8
Turku Finlândia (54)	546	42,1	538	25,3

Tabela1. Freqüência em porcentagem do C1858T do gene PTPN22 em diferentes regiões, em diabéticos e controles normais

Estudos funcionais indicam que a forma variante é incapaz de se ligar à cinase reguladora negativa (CSK), molécula que regula, sob forma negativa, a sinalização do receptor do linfócito T (TCR) (55). A produção de auto-anticorpos é uma característica proeminente deste SNP, que confere susceptibilidade ao DM1A (RR=1,67) e as doenças auto-imunes órgão-

específicas e sistêmicas como artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil, LES, doenças de Graves e Hashimoto, mas não esclerose múltipla (41,53,56-57).

Há poucos estudos avaliando o polimorfismo C1858T PTPN22 no Brasil. Sua predisposição para DM1A foi observada em população com alta prevalência de descendentes europeus, no Rio Grande do Sul (77). Em não diabéticos, parece predispor a endometriose (78) e tem maior frequência em portadores da síndrome de Turner, que têm alta propensão a autoimunidade (79). No entanto, não favoreceu a presença de doença tiroidiana em portadores de lúpus eritematoso sistêmico juvenil (80).

A nossa avaliação dos principais genes que predispõem a diabetes tipo 1 em São Paulo, evidenciou:

Os haplótipos ligados ao maior risco relativo foram -DRB1*03 / -DQB1*0201 e -DRB1*04 / -DQB1*0302. Os haplótipos -DRB1*15 / -DQB1*0602 e -DRB1*13 / -DQB1*0603 predominaram nos indivíduos controles (4,70).

Quando comparamos estes dados aos de populações caucasianas, observamos diferenças: não verificamos o efeito protetor dos alelos –DRB1*07, sendo que -DRB1*11 e -DRB1*15 foram os mais freqüentes no grupo controle (31). Da mesma forma a presença dos alelos -DQB1*0603 e 0301 tem efeito protetor na população avaliada no HCFMUSP-LIM18, enquanto em caucasianos estes alelos não induzem à proteção (4).

Quanto aos alelos de classe I (VNTR-INS), estes foram mais freqüentes nos diabéticos (94% vs 83,3%- p_c=0,003- RR= 1,16) e os alelos de classe III, entre os indivíduos controles (72,8% vs 39,6% - p_c<0,001- RR= 0,76), associados à proteção ao DM1. O genótipo I/I (VNTR) prevaleceu entre os diabéticos (60,4% vs 27,2%) quando comparado aos genótipos I/III e III/III

(p<0,0001- RR=2,0). No entanto, a freqüência do genótipo I/I foi menor na nossa população quando comparada à população caucasóide (75-85% com DM1A e 50-60% no grupo controle (6,70).

Parte das diferenças relatadas entre nossos dados e o de grupos caucasianos pode advir da grande heterogeneidade de nossa população, evidenciando a necessidade de definirmos fatores de risco próprios.

Neste estudo, demos continuidade à avaliação de diabéticos tipo 1A, ampliando nossa casuística e incluindo outros determinantes genéticos.

4. Autoanticorpos: DM1A e outras doenças auto-imunes

4.1 Síndromes Poliendócrinas Autoimunes (SPA)

As Síndromes Poliendócrinas Autoimunes (SPA) apresentam-se de formas variadas quanto às doenças associadas e às caracterísiticas imunológicas, e essa diversidade é importante, tanto na abordagem clínica quanto na instrutiva, principalmente quando levado em conta suas manifestações imunológicas.

Várias doenças autoimunes estão associadas às APS e podem ser sintomáticas ou assintomáticas, como a doença Celíaca (DC), e, são freqüentemente diagnosticadas após anos da doença em curso. Outras ainda são marcadamente diagnosticadas como é o caso do diabetes tipo1 A, cujo diagnóstico é seguido da dependência crônica de insulina exógena.

A palavra “poliendócrina” é inapropriada, pois nem todos os pacientes apresentam múltiplos distúrbios endócrinos e, muitos deles, não apresentam

nenhuma deficiência autoimune endocrinológica. O reconhecimento de pacientes com doenças autoimunes, que podem ser portadores de uma síndrome genética específica, que implica em risco aumentado para múltiplas doenças autoimunes para eles e seus familiares, propiciará diagnósticos precoces e, conseqüente, tratamentos adequados (23-26).

As Síndromes Poliendócrinas Autoimunes compreendem três tipos principais:

4.1.1 IPEX

Síndrome extremamente rara, geralmente ocorre em neonatos, com freqüente evolução fatal. Trata-se de uma enteropatia ligada ao cromossomo X, caracterizada pela extrema imunodeficiência, diarréia e diabetes tipo 1 A. Os estudos sugerem anormalidade no gene Foxp3 (23, 24, 26).

4.1.2 APS1

A Síndrome Poliendócrina Autoimune tipo 1 é uma síndrome rara e grave, de maior prevalência na Finlândia, Sardenha e em judeus iranianos. Ocorre nas primeiras fases da vida, tipicamente em crianças com infecção persistente por candidíase cutânea e mucosa, sem infecção sistêmica por este fungo e, geralmente, associada à imunodeficiência grave. Freqüentemente o diagnóstico é tardio, detectado pela hipocalcemia do hipoparatireoidismo ou doença de Addison no jovem (23-26).

É de causa monogênica, devido à mutação do gene imunorregulador Aire (*autoimmune regulator*). Pacientes que apresentam duas das seguintes condições específicas: candidíase mucocutânea, hipoparatireoidismo ou doença de Addison, quase sempre apresentam mutação desse gene. Mutações do gene Aire são ainda responsáveis por várias outras doenças autoimunes, que se desenvolvem no decorrer dos anos, incluindo diabetes tipo 1A, doença autoimune da tireóide, anemia perniciosa, alopecia, vitiligo, hepatite, atrofia ovariana e ceratiti (23-26).

Após o diagnóstico, o acompanhamento cuidadoso se faz necessário, pois esse monitoramento ajuda na prevenção das afecções oriundas do diagnóstico tardio das doenças auto-imunes associadas, como por exemplo o câncer oral no caso da candidíase mucocutânea (26).

4.1.3 SPA 2

A Síndrome Polinendócrina Auto-imune tipo 2 é a mais frequente. O distúrbio genético não é monogênico e esse complexo genético alterado é semelhante ao das doenças associadas isoladamente, como a doença de Addison e a tireoidite auto-imune (14,23,24,26). Apresenta manifestações mais diversificadas. Hipotensão sintomática, que é uma apresentação clássica da insuficiência adrenal na SPA2, pode estar associada com a diminuição da dose de insulina do paciente portador de diabetes tipo 1A. Pacientes com SPA2 podem apresentar hiperpigmentação e vitiligo e, também, quadros graves e intermitentes de hipoglicemia e fadiga, por vários anos, até que sejam diagnosticados (23).

Quando uma disfunção rara, como a doença de Addison, ocorre espontaneamente, existe uma grande probabilidade de outras doenças autoimunes estarem presentes ou virem a desenvolver-se. No caso da doença auto-imune da tireóide, que ocorre muito freqüentemente de forma isolada, o desenvolvimento de outra doença autoimune endócrina associada é menos comum. Aquelas de prevalência intermediária, como o diabetes tipo 1A e a doença celíaca são, freqüentemente, associadas a outras doenças autoimunes. Como exemplo, temos que aproximadamente 1,5% dos pacientes portadores de DM1A têm auto-anticorpo anti-21 hidroxilase (anti-21HO) e risco elevado para doença de Addison, que se manifesta em um terço desses pacientes (24,26).

5. Doenças autoimunes órgão-específicas associadas ao DM1A

Doenças autoimunes órgão-específicas são frequentes em pacientes diabéticos, e incluem: doença autoimune da tiróide, doença celíaca, gastrite auto-imune, doença de Addison, anemia perniciosa, insuficiência ovariana autoimune, entre outras (29, 75, 81, 82,). Cursam com a presença de auto-anticorpos órgão-específicos, que ajudam, quando da sua detecção precoce, extensivo também aos familiares dos pacientes DM1A, quanto na prevenção de complicações associadas ao seu diagnóstico tardio (29, 75, 81). A base genética pode afetar a propensão à doença autoimune, que é variável, dependendo da região onde o paciente vive, frente aos fatores ambientais que participam como desencadeadores dessas doenças (29,81).

5.1 Doença autoimune tireoideana (DAT)

É a doença autoimune mais freqüente associada ao DM1A e os auto-anticorpos presentes são (82): anti-tireoglobulina (ATg), anti-tireoperoxidase (ATPO) e anti-receptor do TSH (TRAb); O anticorpo anti-tireoperoxidase é um autoanticorpo dirigido à enzima peroxidase e o anti-TG, à molécula da tireoglobulina presentes nas células foliculares da tireóide (81,82). São encontrados em pacientes portadores de doenças tireoidianas autoimunes, como doença de Basedow-Graves e tireoidite de Hashimoto. O TRAb consiste de um conjunto de autoanticorpos dirigidos aos receptores de tireotrofina (TSH), nas células tireoidianas. Esses autoanticorpos são geralmente do tipo estimulador, levando a tireóide a produzir quantidades excessivas de hormônios tireoideanos, como acontece no hipertiroidismo associado à doença de Basedow-Graves. Mais raramente, os autoanticorpos podem ser do tipo bloqueador, ocupando os receptores de TSH e impedindo que o TSH normal se ligue a estes receptores. Neste caso, ocorre uma menor produção de hormônios tireoideanos, levando ao hipotiroidismo associado à tireoidite de Hashimoto (4,15).

Os auto-anticorpos estão presentes em 50-80% dos pacientes portadores de doença de Basedow-Graves e em 90-100% dos casos de tireoidite de Hashimoto. A prevalência dos auto-anticorpos tireoideanos é de 15-30% em portadores de DM1A *versus* 10-13% da população geral. Em estudo de seguimento dos diabéticos por 20 anos, o hipotireoidismo ocorreu em 80% dos pacientes com anti-tireoglobulina ou anti-peroxidase positivos (4,15) e a

prevalência da tireoidite aumentou com a idade, além de apresentar associação com outras doenças auto-imunes (4).

5.2 Doença Celíaca

A doença celíaca (DC) cursa com intolerância ao glúten da dieta e é caracterizada por inflamação, atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas da mucosa do intestino delgado, por processo autoimune mediado por linfócitos T (81,82,86). Com a retirada do glutén, essas lesões da mucosa tendem a evoluir para a recuperação tecidual. O diagnóstico é feito através de biópsia da mucosa do intestino delgado proximal e a presença de auto-anticorpos circulantes anti-endomísio (anti-Endm) e transglutaminase (anti-tTG) (82-84,86). A susceptibilidade genética à doença celíaca é determinada, em aproximadamente 90% dos casos, pela região do HLA (alelos –DR3/DQ2) (77) mas também há participação de genes não-HLA, como os polimorfismos do gene MIC-A (81).

A doença celíaca parece ser menos freqüente do que a doença autoimune da Tireóide, mas ainda é comum entre pacientes com DM1A (29,75,82,84). A maioria das estimativas apontam para uma prevalência próxima de 1% da população geral(29,75,82,84,85) e evidências recentes sugerem que as taxas de soroprevalência aumentaram quatro vezes nos últimos 50 anos (86). Já no diabetes a incidência varia de 4% a 9% (12), As manifestações clínicas podem ser leves e incluem retardo do crescimento, dor abdominal e flatulência, infertilidade, diminuição da mineralização óssea, hipocalcemia com deficiência

de vitamina D, alterações psiquiátricas e neurológicas. Há risco aumentado de malignidade, especialmente linfoma gastrointestinal (12).

5.3 Doença de Addison

A doença de Addison (DA) cursa com a insuficiência adrenal primária. É uma doença rara (87), com relatos de incidência, em países europeus, de cerca de 100 pacientes por milhão de habitantes (87,88), sendo maior na Escandinávia (140 por milhão) (87,89). É quase exclusivamente auto-imune e apresenta elevada comorbidade. A presença de autoanticorpos anti 21-hidroxilase e os alelos HLA de classe II podem ser preditores clinicamente relevantes (87). O maior risco está associado ao genótipo HLA-DR3-DQ2/DRB1*0404/DQ8, que é bastante específico para a insuficiência adrenal auto-imune (87,90,91). A presença de anticorpos circulantes contra a 21-hidroxilase, uma das enzimas que participam na biossíntese de esteróides supra-renais (87,92), é o marcador da forma auto-imune da doença (87).

Cerca de 50% dos pacientes com a doença de Addison têm, associados, a doença autoimune da tireóide e / ou diabetes mellitus tipo 1A, definindo a APS tipo 2 (APS-2)(24,75,84). As mulheres, geralmente são mais atingidas que os homens, e são diagnosticadas entre 20-50 anos de idade (87,90,91). Na progressão da insuficiência adrenal há, inicialmente, aumento de atividade de renina plasmática, seguida de aumento dos níveis séricos de ACTH e redução do cortisol após estímulo com ACTH (4,12).

A doença de Addison, diagnosticada e tratada, tem a expectativa de vida considerada normal. No entanto, crises fatais adrenais são encontradas na prática clínica, mas a incidência de tais causas de mortes não é conhecida (11). Ao longo da vida, o tratamento com a reposição de glicocorticóides pode causar danos, pois a maioria dos pacientes recebe doses supra-fisiológicas, que podem eventualmente elevar o risco de doenças cardiovasculares, distúrbios metabólicos, infecções ou câncer (13).

5.4 Insuficiência ovariana autoimune

A insuficiência ovariana primária é definida por amenorréia hipergonadotrófica com início antes dos 40 anos de idade. Em 4-5% dos pacientes decorre de processo autoimune do tecido ovariano (93).

A Insuficiência ovariana autoimune (IOA) é causada pela destruição seletiva imuno mediada das células da teca, com a preservação das células da granulosa, que produzem baixas quantidades de estradiol devido à falta de substratos. Normalmente, as concentrações séricas de inibinas são maiores em mulheres com IOA, quando comparadas às das mulheres férteis e saudáveis e mulheres com outras formas de insuficiência ovariana. (94)

A presença de auto-anticorpos circulantes dirigidos contra enzimas da esteroidogênese, como 21β-hidroxilase (21OH), 17α-Hidroxilase (17OH), e a enzima de clivagem da cadeia lateral (P450scc), caracteriza a Insuficiência Ovariana Autoimune, devido à autoimunidade às células esteroidogênicas (93,94). Mulheres com IOA são positivas para os chamados auto-anticorpos

anti-células esteróides (ACE), que reagem com antígenos presentes nos ovários, testículos e suprarrenais (93,94)

5.5 Anemia perniciosa

A anemia perniciosa é considerada uma doença auto-imune que cursa com auto-anticorpos contra o fator intrínseco gástrico e contra as células parietais, associados à lesão autoimune grave da mucosa gástrica [este+6). A anemia macrocítica é causada pela deficiência da absorção da vitamina B12, decorrente da deficiência do fator intrínsico associada à gastrite atrófica do corpo gástrico e seu diagnóstico é baseado na confirmação histológica.

Marcadores sorológicos podem sugerir a lesão tecidual, como o aumento da gastrina e diminuição do pepsinogênio I, em jejum. A anemia perniciosa é considerada essencialmente uma doença de idosos. Os mais jovens representam cerca de 15% dos pacientes. Outras doenças autoimunes podem ser concomitantes: da tireóide (40%), diabetes mellitus tipo 1A (10%) e vitiligo (6-8).

Sua suscetibilidade genética também está relacionada ao Sistema Leucocitário Humano, sendo o genótipo: HLA DRB1*03 e-DRB1*04, o de maior suscetibilidade (20). Estudos experimentais e clínicos recentes sugerem, fortemente, o envolvimento de longa data da infecção pelo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (95,96).

6. Outras doenças autoimunes podem cursar paralelas ao DM1A, e podem ser identificadas pelos seguintes autoanticorpos:

6.1 Fator reumatóide (FR)

Auto-anticorpo utilizado para o diagnóstico da Artrite Reumatóide (AR) e outras doenças difusas do tecido conjuntivo. Está presente em cerca de 80% dos adultos com diagnóstico de AR e em cerca de 20% das crianças com artrite reumatóide juvenil. O fator reumatóide é um auto-anticorpo, geralmente da classe IgM, dirigido contra o fragmento Fc da IgG, e tem significado clínico na AR quando em títulos maiores que 80 UI/ml. Títulos menores podem aparecer em outras doenças difusas do tecido conjuntivo (LES, síndrome de Sjögren, esclerodermia, doença mista do tecido conjuntivo, dermatomiosite /polimiosite) e em várias doenças infecciosas (mononucleose infecciosa, tuberculose, sífilis, endocardite bacteriana, hepatites virais).

6.2 Fator anti-nuclear (FAN)

Na população normal, abaixo de 50 anos, espera-se resultado negativo. O resultado positivo é sugestivo de doença difusa do tecido conjuntivo, mas a interpretação dos resultados é altamente dependente dos títulos de anticorpo, padrões de fluorescência e correlação com dados clínicos. População normal, particularmente indivíduos idosos, pode apresentar títulos baixos de anticorpos

antinucleares, bem como pacientes portadores de infecções, processos tumorais e uso de drogas, como por exemplo, clorpromazina, procainamida e hidralazina.

Os anticorpos anti-nucleares reagem imunologicamente com constituintes macromoleculares do núcleo celular. Proteínas solúveis e núcleo-proteínas, juntamente com componentes cromatínicos, freqüentemente tornam-se sítios antigênicos para auto-anticorpos em pacientes portadores de doenças reumáticas sistêmicas. 95% a 100% dos pacientes com LES ativo e não tratado possui anticorpos antinucleares demonstráveis no soro.

Em ensaios de imunofluorescência (IF), a localização celular de antígenos produz padrões característicos, associados à presença de anticorpos específicos ou grupos de anticorpos. Os padrões de imunofluorescência devem ser complementados por testes específicos para a detecção de autoanticorpos clinicamente significativos.

A pesquisa de FAN em HEp-2 funciona como teste de triagem. Na diluição inicial de 1:40; qualquer teste positivo para anticorpos antinucleares por IFI em HEp-2 é titulado até a última diluição 1:1280. Autoanticorpos específicos devem ser automaticamente pesquisados na dependência do padrão de fluorescência observado, incluindo anti-DNA nativo, anti-Sm, anti-SS-A (Ro), anti-SS-B (La), anti-RNP, anti-Scl-70 e anti-Jo-1. Estes auto-anticorpos são freqüentes no LES e Síndrome de Sjögren.

6.3 Anti-músculo liso

Anticorpos anti-músculo liso são marcadores de um subgrupo de pacientes com Hepatite Autoimune (tipo I) e constituem em um dos mais importantes testes laboratoriais para o diagnóstico desta enfermidade.

6.4 Anti-microssomal de fígado e rim (anti-LKM-1)

Os autoanticorpos anti-microssomal de fígado e rim (anti-LKM-1) são encontrados em um sub-gupo de pacientes com Hepatite Autoimune, geralmente com FAN negativo. A hepatite autoimune anti-LKM1 positiva é a doença hepática autoimune mais comum da infância e tem prognóstico ruim, na maioria das vezes.

A justificativa para o estudo da região 5' proximal do gene da IL-21 e do polimorfismo C1858T do gene PTPN22 em pacientes com DM1A e outras doenças autoimunes.

A etiologia do DM1A é complexa, Os estudos genéticos trouxeram enorme contribuição para o seu conhecimento. Entretanto, ainda não estão totalmente definidos os mecanismos moleculares e as citoquinas que controlam o surgimento deste processo inflamatório.

Estudos anteriores em nossa população não evidenciaram a importância da via Th17 na patogênese de DM1A, diferentemente do observado em modelos animais de diabetes autoimune. A avaliação da região promotora proximal da citocina inflamatória IL-21 em humanos poderá auxiliar na definição de seu papel no DM1A e em outras doenças autoimunes associadas.

Sabemos que fatores étnicos e ambientais participam na gênese e progressão do DM1A. Grande parte dos estudos do C1858T PTPN22 em diabéticos foram realizados em populações caucasianas. No Brasil, apenas uma população, de ancestralidade européia, foi analisada, evidenciando a necessidade de ampliarmos seu estudo, abrangendo também outras doenças autoimunes .

Análises trans-raciais com avaliações caso/controle são ferramentas poderosas nos estudos de associações genéticas em doenças multifatoriais, auxiliando a evidenciar efeitos de etnia e desequilíbrio de ligação nos genes de predisposição à doença, justificando a nossa proposiçao.

Tais avaliações podem contribuir para melhor entendimento dos mecanismos autoimunes associados à patogenia do DM1A.

Objetivo: Avaliar o papel dos genes da IL-21 e do PTPN22 na patogênese do DM1A através de:

- Análise da região 5' proximal do gene da IL21 e do C1858T PTPN22 em pacientes com DM1A em comparação com indivíduos controles normais;
- Correlação dos resultados obtidos com as características fenotípicas de nossa população e expressão de autoimunidade (títulos de autoanticorpos).

PACIENTES E MÉTODOS

PACIENTES E MÉTODOS

1. Condições éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todas as coletas foram realizadas após assinatura de termo de consentimento e prévia orientação.

2. Casuística:

2.1 Pacientes

Foram estudados 612 pacientes diabéticos tipo 1A (DM1A), com idade de 2-70 anos (26,8 ± 11,8) e idade do diagnóstico de 0,7-34 anos (11,35 ± 7,3); 59,5% do sexo feminino (F), e 40,5% do sexo masculino (M). A duração da doença variou de 0,04-50 anos (10,56 ± 9,83). Os pacientes foram recrutados nos Ambulatórios de Diabetes do Hospital das Clínicas da FMUSP ou encaminhados por médicos interessados na pesquisa.

Critérios de inclusão:

- Hiperglicemia grave, ou cetoacidose no diagnóstico
- Necessidade precoce de terapia insulínica – inferior a 6 meses do diagnóstico
- Idade menor ou igual a 34 anos

Critérios de exclusão:

- Outros tipos de diabetes
- Irmãos biológicos

2.2 Grupo Controle (GC)

O grupo controle normal (GC) estudado foi de 792 indivíduos, voluntários aleatórios e voluntários do Exército Brasileiro.

Critérios de inclusão:

- Indivíduos saudáveis
- Sem história familiar de diabetes (pais, filhos e avós)

Critérios de exclusão:

- doença auto-imune prévia
- glicemia de jejum e/ou hemoglobina glicada alteradas

3. Métodos

3.1 Marcadores imunológicos

A avaliação da presença dos auto-anticorpos foi efetuada no soro de sangue coletado. O soro foi imediatamente fracionado em vários tubos para manter alíquotas estocadas a -20°C. As diferentes análises foram efetuadas em uma das frações do soro original, evitando-se assim usar alíquotas

descongeladas várias vezes. Os autoanticorpos compreenderam os seguintes marcadores imunológicos:

Pancreáticos

- anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65)
- anti-tirosino fosfatase (anti-IA_2)

Não-pancreáticos (relacionados a outras doenças auto-imunes)

- anti-peroxidase (anti-TPO)
- anti-tireoglobulina (anti-TG)
- anti-receptor do TSH (TRAb)
- fator anti-núcleo (FAN)
- fator reumatóide (FR)
- anti-endomísio (anti-endom)
- anti-músculo liso (AML)
- anti-microssomal de fígado e rim (anti-LKM1)
- anti-célula parietal (anti-CP)
- anti-21 Hidroxilase (anti-21OH)

Em caso de FAN positivo, foram também determinados:

- anti-DNA nativo (anti-DNAn)
- anticorpo anti-sm (anti-SMITH)
- anticorpo anti-SS-B (LA) (anti-LA)
- anticorpo anti-SS-A (RO) (anti-RO)

3.1.1 Auto-anticorpos pancreáticos

- **Anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD65) e Anti-tirosino fosfatase (anti-IA_2)**

Os auto-anticorpos pancreáticos foram dosados por radioimunoensaio (reagentes da RSR, UK). O antígeno recombinante marcado (GAD65 ou IA_2) com Iodo radioativo foi incubado com o soro a ser analisado e os complexos antígeno-anticorpo formados, tratados com suspensão de proteína A e separados por centrifugação. A radioatividade do precipitado contendo o imunocomplexo foi quantificada em contador gama automático, utilizando programa específico para obtenção de resultado diretamente da curva de padrões realizada no mesmo ensaio. A unidade utilizada é U/mL, valor arbitrário do fabricante RSR.

O nível médio de anti-GAD65 obtido no nosso laboratório, em 282 indivíduos controles, foi 0,12 ± 0,23 U/mL e os coeficientes de variação intra e inter ensaios foram de 3,0 e 5,5%, respectivamente. Foram consideradas negativas as amostras com anti-GAD65 de 0 a 1,0 U/mL (média ± 3DP). Os valores > 1,0 U/mL foram considerados positivos.

A nossa população controle apresentou valores médios de anti-IA_2 de 0,07 ± 0,13 U/mL. Foram consideradas negativas as amostras com valores entre 0 e 0,8 U/mL (média ± 3DP). As variações intra e inter ensaios foram 4,3% e 3,4%, respectivamente. Os valores > 0,8 U/mL foram considerados positivos.

3.1.2 Auto-anticorpos não-pancreáticos

- **Anti-peroxidase (anti-TPO) e Anti-tireoglobulina (anti-TG)**

O método utilizado foi o Fluoroimunoensaio indireto com os reagentes da AutoDELPHIA. Valor de referência: < 35 U/mL

- **Anti-receptor do TSH (TRAb)**

O método utilizado foi o Radiorreceptor, marcado com iodo radioativo, reagentes da RSR. Valores de referência:< 8% negativo; 8 a 19% duvidoso; >19% positivo

- **Anti-enzima adrenal 21-hidroxilase (anti-21OH)**

O método utilizado foi o radioimunoensaio de procedência RSR. O soro foi incubado com o antígeno 21-OH hidroxilase recombinante marcado com Iodo radioativo e o imunocomplexo obtido no final com proteina A, foi separado por centrifugação. A presença do auto-anticorpo foi avaliada diretamente das contagens radioativas automatizadas e pela curva-padrão realizada no mesmo ensaio. Considerado normal ou negativo valor menor ou igual a 1 U/ml de unidade arbitrária.

Fator anti-nuclear (FAN)

O método utilizado foi a Imunofluorescência indireta (IFI) em células HEp-2. Para qualquer teste positivo (diluição 1/40), o soro foi titulado até 1/1280, seguido de determinação dos autoanticorpos específicos: anti-DNA nativo (anti-DNAn), anti-Sm (Anti-SMITH), anti-SS-A (Ro), anti-SS-B (La), anti-RNP, anti-Jo-1. Valores de referência: Negativo (não reagente)

- **Fator reumatóide (FR)**

O método utilizado foi a Nefelometria. Valor de referência: < 20 UI/mL.

- **Anti-músculo liso (AML)**

O método utilizado foi a Imunofluorescência Indireta em lâminas de microscópio fixadas com tecido de parede de estômago de rata. Valor de referência: Negativo (não reagente)

- **Anti-microssomal de fígado e rim (anti-LKM-1)**

O método utilizado foi a Imunofluorescência Indireta, utilizando lâminas de microscópio fixadas com cortes de tecido hepático e renal de rato. Valor de referência: Negativo (não reagente)

- **Anti-célula parietal (anti-CP)**

O método utilizado foi a Imunofluorescência Indireta em lâminas de microscópio fixadas com tecido de parede de estômago de rata. Valores de referência: Negativo (não reagente)

3.2 Marcadores genéticos

A extração de Ácido Desoxirribonucléico genômico (DNAgen) de leucócitos de sangue total periférico, colhido com EDTA, foi feita pelo método de *salting out*. A região 5' proximal (promotor) da IL-21 (IL-21p) foi amplificada pela técnica de polimerização em cadeia (PCR), utilizando oligonucleotídeos específicos para a região -448pb+83pb pares de base e seqüenciada. O polimorfismo do gene PTPN22 (C1858T-PTPN22) foi determinado por ensaio de restrição. Os alelos DR do Sistema Leucocitário de Antígenos Humanos (HLA) do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC), foram genotipados por PCR alelo específica.

3.2.1 Região 5' proximal da IL21 (-448pb +83pb)

Amplificação IL-21p

As amplificações, utilizando oligonucleotídeos determinados para essa região, foram realizadas a partir do DNA genômico pela técnica da reação de

polimerização em cadeia utilizando 200ng de DNA genômico em 25 µl de reação, contendo 20 pM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 µM trifosfato de nucleotídeo (dNTP) (Invitrogen®), Platinum Taq-DNA Polymerase (Invitrogen®), tampão (20mM Tris-HCl, 50mM KCl pH 8,4) e MgSO4 1,5mM). As condições da PCR foram padronizadas a partir de programa, com gradiente de temperatura: 94°C durante 3 minutos e 30 ciclos de: 94°C por 30 segundos; 55 a 62°C por 30"; 72°C por 2 minutos, finalizando com 72ºC durante 7 minutos.

Na figura 5 está demonstrada a região 5' proximal do gene da IL-21.

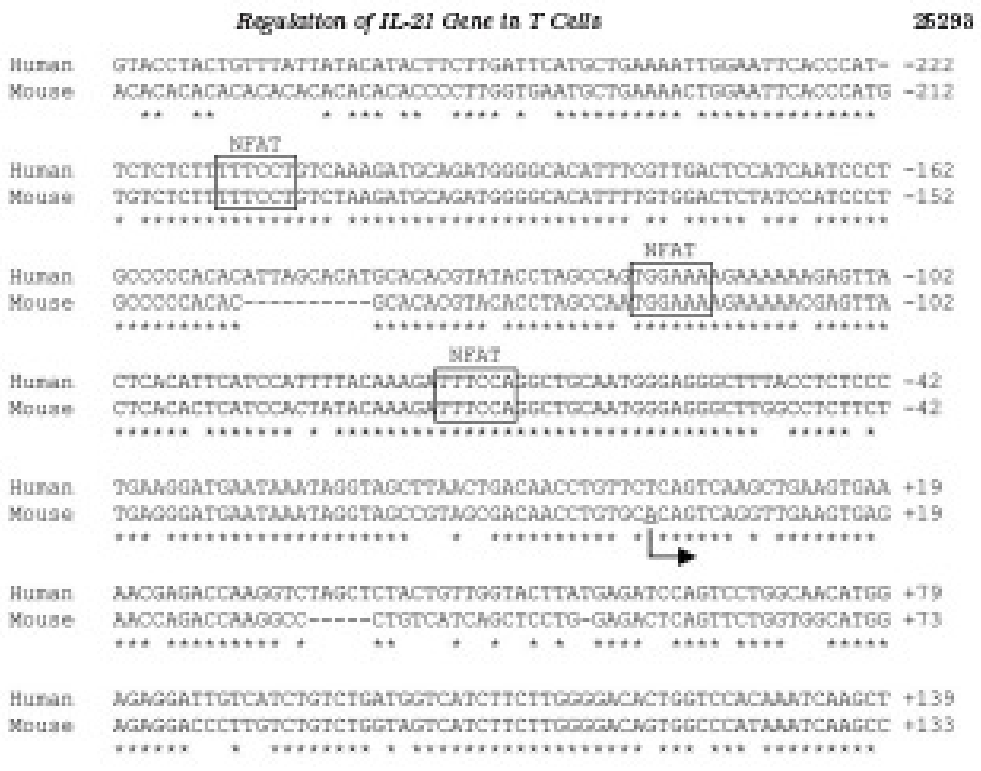

Figura 5. Região 5' proximal do gene da IL-21.

Os oligonucleotídeos iniciadores que foram definidos para abranger a região promotora -448pb +83pb: IL21 (83)R: 5´CTTGATTTGTGGACCAGTGTC -3´; IL 21 (-448)F: 5´-CCTTATGACTGTCAGAGAGAACA -3´, e a temperatura de pareamento foi de 61ºC.

Seqüenciamento da IL-21p

A concentração dos produtos gerados pela PCR foi estimada através do marcador de peso molecular de concentração conhecida (ΦX) em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática com a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2 U/µl) e exonuclease I (10 U/µl) (PCR product pre-sequencing kit, Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA) com incubação a 37°C por 15 minutos seguido de 80°C por mais 15 minutos para inativação das enzimas. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o kit ABI Prism^{TM} BigDye Terminator (Applied Biosystems) com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese, no seqüenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.2.2 Genotipagem do polimorfismo C1858T do gene PTPN22

Para a detecção do polimorfismo C1858T no gene PTPN22, em 10µl do produto amplificado pela PCR, foram acrescentados 2 µl tampão NEB2 e NEB1 (10X), 0,15 µl e 0,1 µl das Enzimas *XcmI* (1U) e *RsaI* (New England – Biolabs Uniscience-EUA), respectivamente, tendo um volume final de 20 µl, com água MilliQ estéril.

A digestão foi processada a 37°C por 120 minutos e inativada a 65°C por 20 minutos, finalizando em 10ºC. Todas estas etapas foram realizadas em termociclador MJ Research PTC 200. O produto foi digerido e visualizado em gel de agarose 3,0%, contendo *SYBR Gold* (Invitrogen®), sob transiluminação em luz ultravioleta (Eletronic U.V. Transiluminador – Ultra Lum).

O sítio de reconhecimento da enzima *XcmI* , consiste da sequencia:

5'...CCANNNNN ' NNNNNTGG... 3'

3'...GGTNNNNN ' NNNNNACC …5'

Desta forma, produto com 215 pares de base, não digeridos por esta enzima, representam o genótipo CC. A presença do alelo T em homozigoze produz um sítio de reconhecimento gerando dois fragmentos, um de 169 e outro de 46 pares de bases. O genótipo CT produz fragmentos com os 3 tamanhos de fragmentos, 215, 169 e 46.

Para confirmação do polimorfismo (1858 C/T), foi utilizada outra enzima de restrição, Rsa I cortando um outro sítio de reconhecimento. Na presença do alelo C em homozigoze, foram gerados dois fragmentos, um de 173 e outro de 42

pares de base e o produto não digerido por esta enzima, representou o genótipo TT.

3.2.3 Genotipagem do Sistema HLA-DR

Genotipagem HLA-DRB1 e DQB1: kit comercial (*Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA typing Tray – Genovision*). A amplificação dos alelos HLA-DRB1 foi realizada pela técnica da PCR alelo específica (*PCR SSP-Sequence Specific Primers*), utilizando o conjunto diagnóstico de tipagem para DRB1 genérico (*Micro SSP™ Allele Generic and Specific HLA classe II DNA Typing Tray-One-Lambda INC*). O Conjunto para análise dos alelos DRB1 é constituído por 23 diferentes oligonucleotídeos iniciadores de seqüências específicas e do gene da β-globina humana, utilizado como controle interno da reação de PCR.

Aos tubos contendo os oligonucleotídeos iniciadores, acrescentou-se: *MIX* de oligonucleotídeos, DNA genômico (100 a 200ng) e a enzima Taq-DNA-polimerase Platinum INVITROGEN 5U/µL (3,5µL para DRB1). A seguir as placas da PCR foram submetidas à amplificação em termociclador (MJ Research PTC 200). As amostras amplificadas foram visibilizadas através do gel de agarose, corado com brometo de etídeo. Os géis são expostos à luz ultravioleta e as imagens, arquivadas e analisadas através de programa específico fornecido pelo fabricante (One Lambda DNA/LMT versão 3.8).

3.3 Outras determinações

3.3.1 Glicemia

Para a dosagem das glicemias, utilizou-se amostras de sangue venoso, colhidas à temperatura ambiente, em tubo contendo fluoreto de sódio - EDTA. O método utilizado foi o enzimático-colorimétrico. Valores de referência: Adultos 70-99 mg/dL (3,89-5,83 mmol/L).

3.3.2 Hemoglobina glicada

A hemoglobina glicada ($HbA1_c$) foi determinada em sangue venoso colhido em frasco contendo anticoagulante EDTA, pelo método de Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC), Variant II Turbo. Valores de Referência: 4,1 a 6,5 % para $HbA1_{C.}$

3.3.3 Peptídeo C

O método utilizado foi o ensaio imunofluorométrico (IFMA), com a determinação em soro obtido de sangue em jejum. O Peptídeo C é um peptídeo liberado quando a pró-insulina é clivada dando origem à insulina. É secretado pelas células beta em concentrações equimolares à da insulina. Valores de referência: 0,4 a 3,6 ng/mL.

3.4 Análise Estatística

Para responder aos objetivos do estudo, primeiramente foram descritas as características dos grupos através de freqüências absolutas e relativas. A associação das variáveis contínuas e caracterizadas, em relação aos grupos (DM1A e GC) foi determinada através dos testes qui-quadrado ou testes exatos de Fisher ou testes da razão de verossimilhanças, sendo esses dois últimos aplicados quando a amostra foi insuficiente para a aplicação do teste qui-quadrado (Kirkwood e Sterne, 2006).

A idade de coleta, glicose e hemoglobina glicada foram descritas segundo grupos com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparadas entre os grupos com uso de teste t-Student (Kirkwood e Sterne, 2006) para a idade e testes Mann-Whitney (Kirkwood e Sterne, 2006) para glicose e HbA1c. O tempo de doença, idade de diagnóstico e glicemia inicial foram descritas apenas no grupo de diabéticos.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Caracterização da população estudada

Pacientes com DM1A (n= 586) tinham menor idade, glicemias e HbA1c mais elevadas e menores níveis de peptídeo C em relação ao grupo controle (n=776) (p<0,001). Tabela 2. A idade do diagnóstico dos pacientes DM1A foi de 0,7-34 anos (11,3 ± 7,3), a duração da doença de 0,04-50 anos (10,6 ± 9,8) e a glicemia, de (185,96 ± 114,27). Tabela 3. Quanto à raça, a branca predominou tanto nos diabéticos como no grupo controle, 81,9% e 65,4%, respectivamente, sendo mais freqüente nos diabéticos (p<0,01), seguida dos pardos, negros e amarelos. O gênero feminino (F) correspondeu a 59,5% no grupo dos diabéticos, e 39% (F) dos controles (p<0,001). Tabela 4.

Variável	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	n	p
Idade (anos)	Controle	28,62	11,75	25	1	75	776	**<0,001***
	DM1A	21,96	12,50	19	1	65	586	
Hemoglobina glicada	Controle	5,77	0,78	5,5	3,9	8,3	587	**<0,001#**
	DM1A	8,45	2,18	8,16	3,28	16,4	482	
Peptídeo C	Controle	2,24	1,86	1,7	0,2	21	767	**<0,001#**
	DM1A	0,31	0,24	0,25	0	1,4	255	

* Resultado do teste t-Student

Resultado do teste Mann-Whitney

Tabela 2. Avaliação dos grupos: diabéticos (DM1A) e controles normais. DP: desvio-padrão. n= espaço amostral.

Variável	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	n
Idade diagnóstico (anos)	DM1A	11,35	7,30	10	0,7	34	558
Duração doença (anos)	DM1A	10,56	9,83	8	0,04	50	525
Glicemia	DM1A	504,93	207,26	500	115	1200	235

Tabela 3. Avaliação da idade de diagnóstico, duração da doença e glicemia atual nos pacientes diabéticos (DM1A).

Variável	Grupo				Total		p
	Controle		DM1A				
	n	%	n	%	n	%	
Cor da pele							**<0,001#**
B	489	65,4	489	81,9	978	72,7	
P	209	27,9	93	15,6	302	22,5	
N	44	5,9	11	1,8	55	4,1	
A	6	0,8	4	0,7	10	0,7	
Total	748	100	597	100	1345	100	
Sexo							**<0,001**
F	309	39,0	364	59,5	673	47,9	
M	483	61,0	248	40,5	731	52,1	
Total	792	100	612	100	1404	100	

Resultado do teste da razão de verossimilhanças

Tabela 4. Comparação do grupo controle e diabéticos (DM1A), quanto à cor da pele: B= branca; P= parda; N= negra; A= amarela, e ao gênero: F= feminino e M= masculino.

2. Seqüenciamento da região 5' proximal da IL-21

O seqüenciamento da região 5' proximal do gene da IL-21 (IL-21p), foi realizado em 309 pacientes DM1A e 189 indivíduos GC. Evidenciou-se apenas uma variante alélica em heterozigoze, na região 5' proximal do gene da IL-21, na posição g.-241 T>A (Fig 6), em uma paciente DM1A, com idade de

diagnóstico de 30 anos, duração da doença de 1 ano e autoanticorpos pancreáticos positivos: anti-GAD= 22,8 UI/mL e anti-$IA_{2=}$ 36,9 UI/mL. Era portadora dos genótipos cc do polimorfismo C1858T PTPN22 e HLA-DR1/DR4. Esta variante alélica não foi encontrada nos outros 497 indivíduos (308 pacientes DM1A e 189 do grupo controle).

Não foi observado nenhum outro polimorfismo nessa região, nem nos portadores de DM1A, nem no grupo GC.

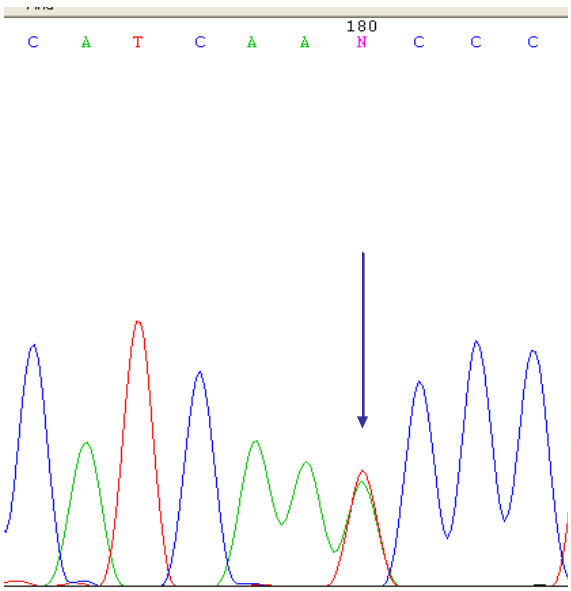

Figura 6 . Variante alélica encontrada na região 5' proximal do gene da IL-21 na posição -241 T>A, em paciente portadora de DM1A.

3. Polimorfismo C1858T do gene PTPN22

3.1 Frequência dos genótipos CC, CT e TT do polimorfismo C1858T do gene PTPN22

O alelo T do C1858T do PTPN22 foi mais freqüente no grupo DM1A (18,7%) que no GC (10,6%) ($p<0,001$). Os genótipos CT e TT conferiram risco 1,94 vezes maior para a doença (OR 1,94; $p<0,001$). Tabela 5.

C1858T PTPN22	Grupo				p
	Controle		DM1A		
	n (689)	%	n (434)	%	
					<0,001
CC	616	89,4	353	81,3	
CT/TT	73	10,6	81	18,7	

Tabela 5. Freqüência do polimorfismo C1858T do gene PTPN22, CC alelo selvagem e CT alelo heterozigoto e TT alelo homozigoto do polimorfismo, em pacientes diabéticos (DM1A) e grupo controle (GC).

3.2 Freqüência do polimorfismo C1858T PTPN22 relacionado ao gênero e raça

Quando avaliamos todos os indivíduos, diabéticos e grupo controle, os genótipos CT e TT foram mais freqüentes na raça branca (p=0,009) e não apresentaram predomínio de gênero (p=0,293), Tabela 6.

Variável	PTPN22				Total		p
	Selvagem		Hetero/homo mutado				
	n	%	n	%	n	%	
Cor da pele							**0,009#**
B	637	68,6	116	78,9	753	70,0	
P	234	25,2	29	19,7	263	24,4	
N	49	5,3	2	1,4	51	4,7	
A	9	1,0	0	0,0	9	0,8	
Total	929	100,0	147	100,0	1076	100,0	
Sexo							0,293
F	428	44,2	75	48,7	503	44,8	
M	541	55,8	79	51,3	620	55,2	
Total	969	100,0	154	100,0	1123	100,0	

Resultado do teste da razão de verossimilhanças

Tabela 6. Freqüência dos genótipos CC, CT/TT do polimorfismo C1858T do gene do PTPN22 quanto ao gênero e cor da pele.

3.3 Polimorfismo C1858T do gene PTPN22 e autoanticorpos

A variante C1858T do gene PTPN22 foi associado com maior freqüência dos seguintes autoanticorpos: anti-GAD65 (26.5% vs 15.9%; p=0.002) e anti-TG (22.2% vs 12.4%; p=0.011) quando analisamos pacientes e controles em conjunto. Tabela 7.

Variável	PTPN22				grupo	p
	CC		CT/TT			
	n	%	n	%		
anti-GAD 65						**0,002**
Positivo	145	15,9	38	26,4	DM1A + GC	
Total	910	100,0	144	100,0		
Anti TG						**0,011**
Positivo	76	12,4	20	22,2	DM1A + GC	
Total	614	100,0	90	100,0		

Tabela 7. Freqüência dos autoanticorpos anti-GAD65 e anti-tireoglobulina (anti-TG) nos genótipos selvagem (CC) e polimórficos (CT/TT) do gene PTPN22 em diabéticos (DM1A) e control e normal (GC).

3.4 Polimorfismo C1858T do gene PTPN22 e características clínicas e laboratoriais de pacientes com DM1A

O alelo 1858T não influiu na idade de diagnóstico e valores de glicemia e de HbA1c.

Variável	PTPN22	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	n	p
Idade diagnóstico (anos)	CC	11,08	7,34	10	0,7	34	330	0,561*
	CT/TT	11,62	6,94	10	1	33	74	
Duração doença (anos)	CC	11,12	9,91	9	0,04	42	315	0,934*
	CT/TT	11,23	11,25	9	0,1	50	73	
Hemoglobina glicada (HbA1c)	CC	6,85	2,03	6	3,28	16,4	796	0,392#
	CT/TT	6,97	1,97	6,36	4,5	15,2	120	
Glicemia	CC	520,55	214,04	500	150	1200	152	0,383#
	CT/TT	473,25	171,60	500	120	959	36	
Peptídeo C	CC	1,70	1,59	1,2	0	12,21	775	**0,041#**
	CT/TT	1,58	2,31	0,99	0	21	106	

* Resultado do teste t-Student

Resultado do teste Mann-Whitney

Tabela 8. Avaliação dos genótipos CC e CT/TT do polimorfismo C1858T do gene PTPN22 quanto às características clínicas e laboratoriais dos pacientes diabéticos.

4. Autoanticorpos pancreáticos e não pancreáticos

4.1 Autoanticorpos pancreáticos (AAP)

Anti-GAD e anti-IA2: Os autoanticorpos pancreáticos, anti-GAD e anti-IA_2, foram analisados nos diabéticos e no GC. Os pacientes diabéticos apresentaram freqüência de 46,7% (225/482) de anti-GAD+ e 43,5% (204/469) de anti-IA_2, enquanto o grupo controle, de 1,7% (13/786) e 1,9% (15/786), respectivamente, $p<0,001$ em ambos. Dos 482 pacientes analisados, 60,6% (292/482) tinham um ou outro autoanticorpo pancreático positivo, e 25,9% (125/482) apresentaram os dois autoanticorpos positivos.

Anti-GAD+: O sub-grupo de pacientes com anti-GAD+ (46,7% da nossa população), caracterizou-se por duração média da doença de 6,6 anos, freqüência dos genótipos CT e TT do C1858T PTPN22 de 15,5% , dos alelos HLA-DR*3 (53,3%) e –DR*4 (33,5%) de 86,8% e HLA não-DR*3não-DR*4 de 13,2%.

Anti-IA_2+: positivo em 43,5% (204/469) dos diabéticos, com duração média da doença de 5,1 anos. Os genótipos polimórficos do PTPN22 CT/TT estavam presentes em 14,7%, e os alelos de suscetibilidade em 84,8%, sendo -DR*4 (33,3%) e -DR*3 (44,8%). Os alelos não-DR*3 não -DR*4 tiveram frequência de 15,2%.

Anti-GAD+ e anti-IA_2+: Neste grupo, 125 diabéticos apresentaram dupla positividade dos autoanticorpos pancreáticos, duração média da doença de 5,2 anos. Os genótipos CT/TT do polimorfismo do PTPN22 estavam presentes em 16% e os alelos de suscetibilidade HLA-DR*03 (43,2%), DR*4 (25,6%) e não–DR*3 não-DR*4 (31,2%).

4.2 Autoanticorpos não-pancreáticos (AANP):

Todos os autoanticorpos, exceto o anti-LKM1A, o anti-endomísio e o anti-transglutaminase (sendo que os dois últimos foram determinados apenas no grupo de diabéticos), foram mais frequentes nos diabéticos que no GC. Gráfico 1.

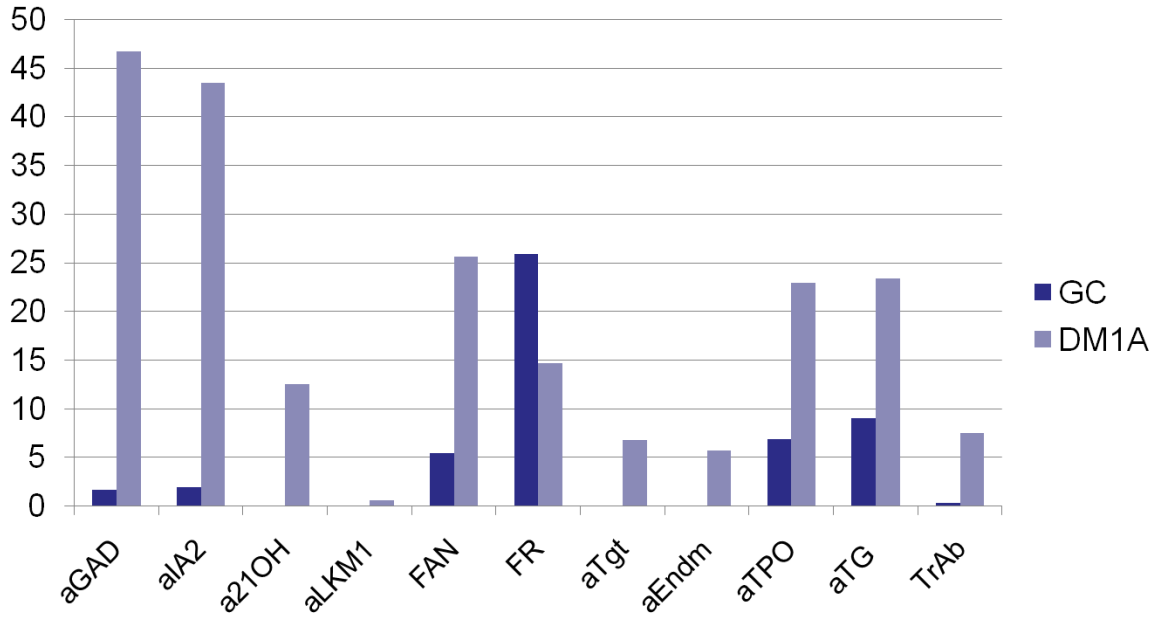

Gráfico 1. Frequência (%) dos autoanticorpos pancreáticos e não-pancreáticos em pacientes diabéticos tipo 1(DM1A) e grupo controle. Autoanticorpos pancreáticos: anti-GAD65: 225 positivos /482 analisados(46.7%) vs 13/786 (1.7%), p<0.001; anti-IA_2 : 204/469 (43.5%) vs 15/786 (1.9%), p<0.001. Autoanticorpos não-pancreáticos: FAN: 60/234 (25.6%) vs 13/239 (5.4%), p<0.001; anti-TPO: 64/279 (22.9%) vs 34/495 (6.9%), p<0.001; anti-TG : 65/278 (23.4%) vs 44/489 (9%), p<0.001; TRAb: 14/187 (7.5%) vs 1/327 (0.3%), p<0.001; anti-21-OH : 8/154 (5,2%) vs 1/160 (0,6%), p< 0,001. Os autoanticorpos a seguir foram realizados apenas nos pacientes diabéticos: anti-tTG 5/73% (6.8%), anti-Endom 10/176 (5.7%).

5. Freqüência dos alelos HLA-DRB1 nos diabéticos e grupo controle

Os alelos HLA-DR3 e/ou –DR4 foram mais frequentes nos diabéticos (p<0.001) (Tabela 9). O alelo –DR4 foi mais prevalente nos diabéticos quando comparados ao grupo controle normal (57,4% *versus* 22,6% do grupo GC), conferindo risco relativo para a doença de 3,79 p<0,0001 (p_c <0,0018 -correção de Bonferrone).

HLA-DRB1	Grupo				p
	Controle		DM1A		
	n (700)	%	n (460)	%	
DR 3	33	4,7	243	52,8	**<0,001**
DR 4	158	22,6	264	57,4	**<0,001**
DR 3 ou DR 4	188	26,9	387	84,1	**<0,001**
DR 3 e DR 4	3	0,4	120	26,1	**<0,001**

Tabela 9. Freqüência dos alelos HLA-DRB1 nos diabéticos (DM1A) e grupo controle.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

DISCUSSÃO

O diabetes mellitus tipo 1A cursa com a destruição imunomediada das células-beta pancreáticas (1,3,64,73), determinada pela complexa interação entre fatores ambientais, imunológicos e genéticos (3),

Fatores genéticos predisponentes contribuem na gênese e progressão do diabetes e também na maior susceptibilidade a outras doenças autoimunes (3,9,13,29). Os genes do sistema HLA respondem por cerca de 50% da susceptibilidade genética do DM1A (37,38,67,83). Outros genes ligados à resposta imune, que codificam moléculas que interferem na ativação e supressão de linfócitos T e na produção de citocinas mediadoras da inflamação, e que controlam tanto a resposta imune inata como a adaptativa, também têm papel crítico nesta predisposição (4,5,40,41,83). A identificação dos mecanismos que coordenam estes processos, incluindo outros determinantes genéticos atuantes na autoimunidade, permitirá a abordagem terapêutica mais efetiva do diabetes (3,5,17,26,75,83).

Com o intuito de ampliarmos o conhecimento sobre os mecanismos que predispõem ao DM1A e suas interfaces com outras doenças autoimunes relacionadas ao diabetes, direcionamos nossa pesquisa para dois genes atuantes na resposta imune: o gene PTPN22, na expressão do alelo 1858T, e o gene da IL-21, avaliando sua região promotora. Neste estudo, realizado em 612 pacientes DM1A e 792 controles normais, analisamos o papel predisponente destes genes no diabetes tipo 1A e também em outras doenças autoimunes, através da determinação de clássicos marcadores da autoimunidade: os autoanticorpos específicos. Assim, autoanticorpos pancreáticos (IAA, anti-GAD e anti-IA2) e contra outros órgãos e tecidos foram incluídos na pesquisa.

A detecção de auto-anticorpos, frequentemente presentes no sangue anos antes da manifestação clínica da doença, é uma importante ferramenta para o diagnóstico da agressão imune e o conhecimento de sua prevalência na população com diabetes pode direcionar a freqüência de sua determinação, a qual é importante no diagnóstico precoce e tratamento destas doenças.

Características da População com DM1A

A raça branca foi a mais prevalente nos dois grupos.

No grupo com diabetes, como esperado, houve maior freqüência de brancos (81,9%) em relação aos controles (65,4%), já que o DM1A ocorre principalmente em brancos ou populações miscigenadas com brancos (3,4,5,8,41,53).

O grupo com DM1A apresentou menor idade média e maiores valores de glicemia e HbA1c em relação aos controles. Diabetes tipo 1 A também predispôs à maior freqüência de todos os autoanticorpos (pancreáticos e não pancreáticos) analisados, exceto para o anti-LKM1. Na população com diabetes, os autoanticorpos mais freqüentes foram o anti-GAD e anti-IA2, seguidos dos autoanticorpos anti-21OH, anti-tireóide e anti-núcleo (FAN).

IL-21

A IL-21, citocina do tipo I, é membro da família de interleucinas de cadeia gama comum, juntamente com a IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e atua na homeostase das células T (44). Está envolvida no crescimento e sobrevida das células T e na expansão ou restrição do repertório celular do sistema imune (44-46). Paralelamente, inibe a diferenciação, a manutenção e a sobrevivência das células T reguladoras, supressoras da autoimunidade, influindo negativamente na atividade funcional destas células (44-46,49). Produzida principalmente pelos linfócitos T CD4+ , a IL-21 tem ações pleiotrópicas e, em geral, pró-inflamatórias. Está implicada na gênese e progressão de diversas doenças autoimunes, tais como LES, artrite reumatóide e esclerose sistêmica (71) e no modelo animal de diabetes autoimune, o camundongo NOD (44,64,76).

Nestes animais há super-expressão do receptor da IL-21 nas células T de memória, aumento dos níveis de RNA mensageiro da IL-21 e aumento da resposta a esta citocina *in vivo* (33,44,46).

Região 5' proximal da IL-21

Vários fatores de transcrição atuam na expressão da IL-21, alguns deles com sítios de ligação na região 5' proximal do gene da IL-21, como o NFATC2 e o c-MAF, ativadores, e o T-bet , supressor de sua transcrição (44,48,64,76). Assim, variantes na região promotora poderiam estar implicadas na ativação da

via da IL-21, observada nos animais diabéticos**.** Entretanto, ainda não há dados acerca da regulação da IL-21 em humanos que possam predispor ao DM1A, justificando a avaliação da região -448+83pb do gene da IL-21, a qual contempla esses sítios reguladores.

Variante alélica g-241 T>A

No presente estudo identificamos, pela primeira vez, na região 5' proximal do gene da IL-21, a variante g-241 T>A, em heterozigose, em uma paciente diabética tipo 1A, com diagnóstico aos 30 anos e duração da doença de 1 ano. Era portadora de autoanticorpos pancreáticos positivos e também dos genótipos CC do polimorfismo C1858T do gene PTPN22 e HLA-DR1/DR4. A variante encontrada estava ausente em 189 controles, bem como em populações européias e asiáticas (banco de dados- www.ensembl.org/index.html), sugerindo que essa alteração não é um polimorfismo (86). Uma variação alélica é considerada um polimorfismo gênico se está presente em mais de 1% de uma determinada população (86). Esse conceito é baseado na freqüência populacional e não leva em conta os efeitos patogênicos de uma variante (86). A irmã da paciente, portadora da mesma alteração em heterozigose, não apresenta diabetes, sugerindo que essa variante alélica não é determinante do diabetes autoimune no homem. Quanto à idade tardia de diagnóstico, a ausência dos alelos HLA-DR3 e 1858T do PTPN22 pode ter contribuído, considerando que maior freqüência de genes de susceptibilidade parece condicionar o aparecimento do diabetes em idades mais precoces (1,3-6,9,17,26,30,34,38,40,81).

Nenhuma outra variante foi encontrada na região 5'proximal do gene da IL-21, nem no grupo de diabéticos e nem no grupo controle, incluindo o polimorfismo rs77935281 GT , relatado nessa região em banco de dados (www.ensembl.org/index.html**)**, sugerindo que alterações nesta região não estão implicadas na susceptibilidade ao DM1A em humanos ou à expressão da IL-21. Podemos também inferir que variantes polimórficas nesta região não predispõem a outras doenças autoimunes, considerando que muitos pacientes e alguns controles eram portadores de autoanticorpos contra a adrenal, a tireóide e vários outros tecidos. Fatores étnicos, frente à grande diversidade genética da nossa população, também não pareceram influir em nossos resultados.

Outros sítios de transcrição talvez estejam envolvidos na regulação da expressão da IL-21 no homem. McGuire HM et al (82) demonstraram que a elevada produção de IL-21 no camundongo NOD resultava de dois polimorfismos de um único nucleotídeo, na região promotora distal do gene da IL-21, que aumentavam a afinidade de ligação para o fator de transcrição Sp1.

Assim, podemos concluir que variantes alélicas são raras na região 5'proximal do gene da IL-21, o que sugere uma função biológica importante para esta citocina, ou ainda, que ela seja uma molécula relativamente nova do ponto de vista evolutivo (84). Reforçando nossa observação, estudo em população japonesa encontrou apena uma variante alélica no introm 3 do gene da IL-21, predispondo a DM1A (84).

Nossos resultados não parecem justificar os achados de menor expressão de receptores de IL-21 em linfócitos T periféricos de pacientes com DM1A de início recente (71) . Considerando que a expressão de receptores de várias proteínas é, muitas vezes regulada pela concentração das próprias proteínas (31,33,44,49). podemos sugerir que a reduzida expressão de receptores de IL-21 em linfócitos periféricos de pacientes com DM1 de início recente não depende de alterações na região promotora proximal da IL-21.

Polimorfismo C1858T do gene PTPN22

A proteína tirosina fosfatase LYP, codificada pelo gene PTPN22, é um dos mais potentes inibidores da ativação de células T. O polimorfismo C>T na posição 1858, descrita por Bottini et AL (41), predispõe ao diabetes (41,52-54,83) em várias populações.

Estudos funcionais indicam que a variante é incapaz de se ligar à cinase reguladora negativa (csk), molécula que regula, sob forma negativa, a sinalização do receptor do linfócito T (55). Uma característica proeminente deste polimorfismo é a produção de autoanticorpos, conferindo suscetibilidade ao DM1A , bem como a outras doenças autoimunes (41,53,56-57).

Na nossa avaliação, os genótipos CT/TT do C1858T PTPN22 foram mais freqüentes nos pacientes com DM1A que no grupo controle (18,7% vs 10,6% p<0,001), conferindo risco relativo para a doença de 1,94.. No entanto,

a freqüência dos genótipos de risco foi menor que a observada em populações caucasianas, nas quais variou de 26,8% nos EUA a 42,1% na Finlândia (41). O alelo 1858T é praticamente ausente em populações com descendentes africanos e asiáticos (85), o que pode explicar esta diferença, já que a nossa população apresenta heterogeneidade racial importante, com descendentes de ameríndios, africanos, asiáticos e europeus.

Em concordância com estes resultados, observamos predomínio dos genótipos CT/TT na raça branca (p<0,009), quando analisamos os grupos pacientes e controles.

O polimorfismo C1858T do PTPN22 foi ainda associado à maior freqüência do autoanticorpo pancreático anti-GAD (26,5% vs 15,9%; p=0,002) e do autoanticorpo tireoidiano anti-TG (22,2% vs 12,$%; p=0,011), confirmando seu papel predisponente à autoimunidade, à semelhança do observado em outros estudo no Brasil (77,79,83).

Quando analisamos apenas a população com DM1A, a presença do alelo 1858T não influiu nas seguintes variáveis: idade de diagnóstico, valores de glicemia atual e inicial e de HbA1c.

Concluindo, o polimorfismo 1858C/T do gene PTPN22 predispôs ao diabetes autoimune e à maior freqüência de autoanticorpos anti-GAD e anti-TG.

Sistema HLA

Neste estudo os alelos HLA DR3 e DR4 também foram mais freqüentes nos diabéticos que nos controles, à semelhança do observado na literatura (3,4,9,13,29), confirmando que estes alelos condicionam grande susceptibilidade à doença em praticamente todas as populações.

Conclusões

- Variantes alélicas na região 5'proximal do gene da IL-21 não parecem estar relacionadas à suscetibilidade para DM1A e outras doenças autoimunes;
- O polimorfismo C1858T do PTPN22 foi associado à predisposição para o DM1A e doença autoimune da tireóide;
- Autoanticorpos órgão-específicos são mais freqüentes nos diabéticos, principalmente o autoanticorpo pancreático anti-GAD65 e autoanticorpo tireoidiano anti-TG;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Referências bibliográficas

1. de Graaff LC, Smit JW, Radder JK Prevalence and clinical significance of organ-specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus.Neth J Med. 2007 Jul-Aug;65(7):235-47. Review.

2. Diabetes Care. 2011 Jan;34 Suppl 1:S62-9. Diagnosis and classification of diabetes mellitus.American Diabetes Association.

3. Eisenbarth GS. Update in type 1 diabetes.J Clin Endocrinol Metab. 2007 Jul;92(7):2403-7.

4. da Silva MER, Mory D, Davini E. Genetic and humoral autoimmunity markers of type 1 diabetes: from theory to practice]Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008 Mar;52(2):166-80.

5. Jahromi MM, Eisenbarth GS.Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes.Cell Mol Life Sci. 2007 Apr;64(7-8):865-72. Review.

6. Gianani R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes: 2005. Immunol Rev. 2005 Apr;204:232-49.

7. Gamberini M, Correia MRS, Davini E, Alves L, Mainardi-Novo DTO, Miura I, et al. Associação do polimorfismo + 49 A/G no exon 1 do gene CTLA-4 com diabetes melito tipo 1 e suas apresentações clínicas. Arq Bras Endocrinol Metab. 2006;50:S180.

8. Gamberini M, Crisostomo LG, Mainardi-Novo DTO, Longhi MT, Davini E, Alves LI, et al. Genetic Association between the Lymphoid Tyrosine Phosphatase Locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes in caucasians. Program of the 89th Annual Meeting of the Endocrine Society, Toronto, CA, 2007, poster session

9. Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, Yu L, Miao D, Erlich HA, Fain PR, Barriga KJ, Norris JM, Rewers MJ, Eisenbarth GS.Extreme genetic risk for type 1A diabetes.Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Sep 19;103(38):14074-9. Epub 2006 Sep 11.

10. Mainardi-Novo DTO, Gamberini M, Longhi MT, Alves LI, Queiroz MS, Fukui RT, et al. Non-islet autoantibodies (non-isletAAb): prevalence and association with PTPN22 1858T in Brazilian Type I Diabetes Mellitus (DMI) Patients. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007;Supll 1:S103.

11. Mantovani RM, Mantovani LM, Dias VM. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: prevalence and risk factors. J Pediatr Endocrinol Metab. 2007;20(6):669-75.

12. Frisk G, Hansson T, Dahlbom I, Tuvemo T. A unifying hypothesis on the development of type 1 diabetes and celiac disease: gluten consumption may be a shared causative factor.Med Hypotheses. 2008;70(6):1207-9. Epub 2008 Feb 4.

13. Morran MP, Omenn GS, Pietropaolo M. Immunology and genetics of type 1 diabetes.Mt Sinai J Med. 2008 Aug;75(4):314-27.

14. Barker JM, Ide A, Hostetler C, Yu L, Miao D, Fain PR, Eisenbarth GS, Gottlieb PA. Endocrine and immunogenetic testing in individuals with type 1 diabetes and 21-hydroxylase autoantibodies: Addison's disease in a high-risk population. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Jan;90(1):128-34. Epub 2004 Oct 13.

15. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes.Autoimmunity. 2008 Feb;41(1):11-8. Review.

16. Gleicher N, Barad D, Weghofer A. Functional autoantibodies, a new paradigm in autoimmunity? Autoimmun Rev. 2007 Nov;7(1):42-5. Epub 2007 Jul 18. Review.

17. Bagnasco M, Grassia L, Pesce G.The management of the patient with unexpected autoantibody positivity.Autoimmun Rev. 2007 Jun;6(6):347-53. Epub 2007 Feb 15. Review.

18. Karges B, Muche R, Knerr I, Ertelt W, Wiesel T, Hub R, et al. Levothyroxine in euthyroid autoimmune thyroiditis and type 1 diabetes: a randomized, controlled trial. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(5):1647-52

19. SALLES, João Eduardo N. et al . Diabetes mellitus associated with the mitochondrial mutation A3243G: frequency and clinical presentation. Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, v. 51, n. 4, June 2007

20. GURGEL, Lucimary C. and MOISES, Regina S.. Diabetes melito neonatal. Arq Bras Endocrinol Metab [online]. 2008, v. 52, n. 2 [cited 2009-02-25], pp. 181-187.

21. GROSS, Jorge L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. Arq Bras Endocrinol Metab [online]. 2002, v. 46, n. 1.

22. DIB, Sergio Atala. Heterogeneidade do diabetes melito tipo 1. Arq Bras Endocrinol Metab [online]. 2008, v. 52, n. 2 [cited 2009-02-25], pp. 205-218.

23. Michels AW, Eisenbarth GS. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS-1) as a model for understanding autoimmune polyendocrine syndrome type 2 (APS-2).J Intern Med. 2009 May;265(5):530-40. Review.

24. Eisenbarth GS, Gottlieb PA Autoimmune polyendocrine syndromes. N Engl J Med. 2004 May 13;350(20):2068-79. Review.

25. Tomer Y, Menconi F Type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: the genetic connectionThyroid. 2009 Feb;19(2):99-102.

26. Anderson MS. Update in endocrine autoimmunity. J Clin Endocrinol Metab. 2008 Oct;93(10):3663-70. Review

27. Tomer Y, Huber A. The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment J Autoimmun. 2009 May-Jun;32(3-4):231-9.

28. Villano MJ, Huber AK, Greenberg DA, Golden BK, Concepcion E, Tomer Y. Autoimmune thyroiditis and diabetes: dissecting the joint genetic susceptibility in a large cohort of multiplex families. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Apr;94(4):1458-66. Epub 2009 Jan 13

29. Tsirogianni A, Pipi E, Soufleros K. Specificity of islet cell autoantibodies and coexistence with other organ specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus. Autoimmun Rev. 2009 Feb 13

30. Geller M, Scheinberg M. Diagnóstico e tratamento das doenças imunológicas. Rio de Janeiro 2005; seção 1/6:1-39.

31. Abas AK, Lichtman AH. Imunologia Celular e Molecular. 5ª ed. Rio de Janeiro: Revinter;2005; seção III-IV:133-423.

32. Marleau AM, Sarvetnick N. T cell homeostasis in tolerance and immunity. J Leukoc Biol. 2005 Sep;78(3):575-84. Epub 2005 May 13.

33. King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. Cell. 2004 Apr 16;117(2):265-77.

34. Dean BM, McNally JM, Bonifacio E, Jennings AM, Dunger DB, Gale EA, Bottazzo GF. Comparison of insulin autoantibodies in diabetes-related and healthy populations by precise displacement ELISA. Diabetes. 1989 Oct;38(10):1275-81.

35. Franke B, Galloway TS, Wilkin TJ. Developments in the prediction of type 1 diabetes mellitus, with special reference to insulin autoantibodies. Diabetes Metab Res Rev. 2005 Sep-Oct;21(5):395-415.

36. Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Paty DW, Warren S, Hader W, Murray TJ, Seland TP, Duquette P, Grey T, A population-based study of multiple sclerosis in twins. N Engl J Med. 1986 Dec 25;315(26):1638-42.

37. Eizirik DL, Monteiro CM, Voltarelli JC, Foss MC. Frequency of HLA antigens in a Brazilian type I diabetic population. Braz J Med Biol Res. 1987;20(5):533-7.

38. Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Pociot F, Todd JA, Rich SS; Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families.Diabetes.2005Oct;54(10):2995-3001.

39. Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspects of type 1diabetes. MolPathol. 2003 Feb;56(1):1-10.

40. Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: molecular, cellular and clinical immunology. Adv Exp Med Biol. 2004;552:306-10.

41. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D, Mustelin T. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. Nat Genet. 2004 Apr;36(4):337-8. Epub 2004 Mar 7.

42. Khoruts A, Fraser JM. A causal link between lymphopenia and autoimmunity. Immunol Lett. 2005 Apr 15;98(1):23-31. Epub 2004 Nov 24.

43. Geenen V, Brilot F. Role of the thymus in the development of tolerance and autoimmunity towards the neuroendocrine system. Ann N Y Acad Sci. 2003 May;992:186-95.

44. Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. Immunol Rev. 2004 Dec;202:84-95.

45. Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. Nat Rev Immunol. 5:688-98, 2005.

46. Wu Z, Kim HP, Xue HH, Liu H, Zhao K, Leonard WJ. Interleukin-21 receptor gene induction in human T cells is mediated by T-cell receptor-induced Sp1 activity. Mol Cell Biol. 2005 Nov;25(22):9741-52.

47. Kim HP, Korn LL, Gamero AM, Leonard WJ. Calcium-dependent activation of interleukin-21 gene expression in T cells. J Biol Chem. 2005 Jul 1;280(26):25291-7. Epub 2005 May 6.

48. Mehta DS, Wurster AL, Weinmann AS, Grusby MJ. NFATc2 and T-bet contribute to T-helper-cell-subset-specific regulation of IL-21 expression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 8;102(6):2016-21. Epub 2005 Jan 31.

49. Warren J, Leonard Spolski R. interleukin.21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation Nature 5: 688-698, 2005

50. Distler JH, Jungel A, Kowal-Bielecka O, Michel BA, Gay RE, Sprott H, Matucci-Cerinic M, Chilla M, Reich K, Kalden JR, Muller-Ladner U, Lorenz HM,

Gay S, Distler O. Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2005 Mar;52(3):856-64.

51. Jungel A, Distler JH, Kurowska-Stolarska M, Seemayer CA, Seibl R, Forster A, Michel BA, Gay RE, Emmrich F, Gay S, Distler O. Expression of interleukin-21 receptor, but not interleukin-21, in synovial fibroblasts and synovial macrophages of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2004 May;50(5):1468-76.

52. Zheng W, She JX. Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and type 1 diabetes.Diabetes. 2005 Mar;54(3):906-8.

53. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RC, Gough SC, Todd JA. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. Diabetes. 2004 Nov;53(11):3020-3.

54. Hermann R, Lipponen K, Kiviniemi M, Kakko T, Veijola R, Simell O, Knip M, Ilonen J. Lymphoid tyrosine phosphatase (LYP/PTPN22) Arg620Trp variant regulates insulin autoimmunity and progression to type 1 diabetes.Diabetologia. 2006 Jun;49(6):1198-208. Epub 2006 Apr 14.

55. Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, Chang M, Ramos P, Baechler EC, Batliwalla FM, Novitzke J, Williams AH, Gillett C, Rodine P, Graham RR, Ardlie KG, Gaffney PM, Moser KL, Petri M, Begovich AB, Gregersen PK, Behrens TW. Genetic association of the R620W

polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. Am J Hum Genet. 2004 Sep;75(3):504-7. Epub 2004 Jul 23.

56. Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF, Gonzales B, Novitzke J, Kern M, Moser KL, Begovich AB, Carlton VE, Li W, Lee AT, Ortmann W, Behrens TW, Gregersen PK. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes.Am J Hum Genet. 2005 Apr;76(4):561-71. Epub 2005 Feb 17.

57. Prescott NJ, Fisher SA, Onnie C, Pattni R, Steer S, Sanderson J, Forbes A, Lewis CM, Mathew CG. A general autoimmunity gene (PTPN22) is not associated with inflammatory bowel disease in a British population.Tissue Antigens. 2005 Oct;66(4):318-20.

58. Pugliese A, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus of man: genetic susceptibility and resistance. Adv Exp Med Biol. 2004;552:170-203.

59. Velaga MR, Wilson V, Jennings CE, Owen CJ, Herington S, Donaldson PT, Ball SG, James RA, Quinton R, Perros P, Pearce SH. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(11):5862-5.

60. Maier LM, Wicker LS. Genetic susceptibility to type 1 diabetes. Curr Opin Immunol. 2005 Dec;17(6):601-8. Epub 2005 Oct 13.

61. Louise E. Clough[*], Chun Jing Wang[*], Emily M. Schmidt[*], George Booth[†], Tie Zheng Hou[*], Gemma A. Ryan[*] and Lucy S. K. Walker[2] Release from Regulatory T Cell-Mediated Suppression during the Onset of Tissue-Specific Autoimmunity

Is Associated with Elevated IL-21[1]The Journal of Immunology, 2008, 180, 5393 -540.

62. Anderson MS, Bluestone JA. O camundongo NOD: um modelo de desregulação imune. Annu Rev Immunol. 2005; 23:447-85.

63. Zhang L, NakayamaM, Eisenbarth GS Insulin as an autoantigen in NOD/human diabetes. Curr Opin Immunol. 2008 Feb;20(1):111-8.

64. Sutherland AP, Van Belle T, Wurster AL, Suto A, Michaud M, Zhang D, Grusby MJ, von Herrath M Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. Diabetes. 2009 May;58(5):1144-55. Epub 2009 Feb 1

65. Petrone A, Spoletini M, Zampetti S, Capizzi M, Zavarella S, Osborn J, Pozzilli P, Buzzetti R; Immunotherapy Diabetes (IMDIAB) Group. The PTPN22 1858T gene variant in type 1 diabetes is associated with reduced residual beta-cell function and worse metabolic control. Diabetes Care. 2008 Jun;31(6):1214-8. Epub 2008 Feb 5.

66. Lempainen J, Vaarala O, Mäkelä M, Veijola R, Simell O, Knip M, Hermann R, Ilonen J. Interplay between PTPN22 C1858T polymorphism and cow's milk formula exposure in type 1 diabetes. J Autoimmun. 2009 Sep;33(2):155-64. Epub 2009 May 26.

67. Nejentsev S, Howson JM, Walker NM, Szeszko J, Field SF, Stevens HE, Reynolds P, Hardy M, King E, Masters J, Hulme J, Maier LM, Smyth D, Bailey R, Cooper JD, Ribas G, Campbell RD, Clayton DG, Todd JA; Wellcome Trust Case Control Consortium. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. Nature. 2007 Dec 6;450(7171):887-92.

68. Corthay A How do regulatory T cells work? Scand J Immunol. 2009 Oct;70(4):32636.

69. Sakaguchi S, Wing K, Yamaguchi T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. Eur J Immunol. 2009 Sep;39(9):2331-6.

70. Davini E, Silva MER, Alves LI, Correia MRS, Fukui RT, Latrônico AC, et al. O genótipo I/I do locus VNTR do gene da insulina confere risco independente para diabetes mellitus tipo 1 nos pacientes sem os genótipos DRB1 e DQB1 de susceptibilidade. Arq Bras Endocrinol Metab. 2005;49 (Suppl 2):S876

71. Crisostomo LG; N Ori; Santos AS; Fukui, RT , Durval D; Vasconcelos DM, Silva MER. Decreased expression of interleukin-21 receptor (IL-21R) and other common gamma-chain dependent cytokine receptors on peripheral T lymphocytes in type 1A diabetes. P3-597 –. 90th Annual Meeting - The Endocrine Society, San Francisco –June 15-18, 2008

72. Fores, JP, Crisostomo LG, Santos, AS, Pinto, EM, Orii, N, Vasconcelos, DM, Silva, MER. [P1-490] Decreased Expression of Interleukin-17 Receptor (IL-17R) on Peripheral T Lymphocytes in Brazilian Patients with Type 1A Diabetes. In: 91st Annual Meeting, 2009, Washington. Meeting & Exhibit Guide. , v.1. p.33.

73. Grunnet LG, Mandrup-Poulsen T Cytokines and type 1 diabetes: a numbers game.Diabetes. 2011 Mar;60(3):697-9.

74. van den Ouweland JM, Bruining GJ, Lindhout D, Wit JM, Veldhuyzen BF, Maassen JA Mutations in mitochondrial tRNA genes: non-linkage with syndromes of Wolfram and chronic progressive external ophthalmoplegia..Nucleic Acids Res. 1992 Feb 25;20(4):679-82.

75. Triolo TM, Armstrong TK, McFann K, Yu L, Rewers MJ, Klingensmith GJ, Eisenbarth GS, Barker JM. One-Third of Patients Have Evidence for an

Additional Autoimmune Disease at Type 1 Diabetes Diagnosis. Diabetes Care. 2011 Mar 23.

76. Hiramatsu Y, Suto A, Kashiwakuma D, Kanari H, Kagami S, Ikeda K, Hirose K, Watanabe N, Grusby MJ, Iwamoto I, Nakajima H. c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF-beta inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4+ T cells. J Leukoc Biol. 2010 Apr;87(4):703-12. Epub 2009 Dec 30.

77. Chagastelles PC, Romitti M, Trein MR, Bandinelli E, Tschiedel B, Nardi NB Association between the 1858T allele of the protein tyrosine phosphatasenonreceptor type 22 and type 1 diabetes in a Brazilian population. Tissue Antigens. 2010 Aug;76(2):144-8. Epub 2010 Mar 22.

78. Gomes FM, Bianco B, Teles JS, Christofolini DM, de Souza AM, Guedes AD, Barbosa PTPN22 C1858T polymorphism in women with endometriosis. Am J Reprod Immunol. 2010 Mar 1;63(3):227-32. Epub 2010 Jan 12.

79. Bianco B, Verreschi IT, Oliveira KC, Guedes AD, Galera BB, Galera MF, Barbosa CP, Lipay MV. PTPN22 polymorphism is related to autoimmune disease risk in patients with Turner syndrome. Scand J Immunol. 2010 Sep;72(3):256-9.

80. Parente Costa L, Bonfá E, Martinago CD, de Oliveira RM, Carvalho JF, Pereira RM Juvenile onset Systemic Lupus Erythematosus thyroid dysfunction: a subgroup with mild disease? Autoimmun. 2009 Sep;33(2):121-4. Epub 2009 May 5.

81. Era 75 *HLA Genes, Islet Autoantibodies and Residual C-Peptide at the Clinical Onset of Type 1 Diabetes Mellitus and the Risk of Retinopathy 15 Years Later.Jensen RA, Agardh E, Lernmark A, Gudbjörnsdottir S, Smith NL, Siscovick DS, Törn C; on behalf of the DISS Group. PLoS One. 2011 Mar 11;6(3):e17569.*

82. McGuire HM, Vogelzang A, Hill N, Flodström-Tullberg M, Sprent J, King C. Loss of parity between IL-2 and IL-21 in the NOD Idd3 locus. Proc Natl Acad Sci U S A.2009. 106:19438-43.

83. Stanford SM, Mustelin TM, Bottini N. Lymphoid tyrosine phosphatase and autoimmunity: human genetics rediscovers tyrosine phosphatases. Semin Immunopathol. 2010 Jun;32(2):127-36. Epub 2010 Mar 4. Review.

84. Asano K, Ikegami H, Fujisawa T, Nishino M, Nojima K, Kawabata Y, Noso S, Hiromine Y, Fukai A, Ogihara T. Molecular scanning of interleukin-21 gene and genetic susceptibility to type 1 diabetes. Hum Immunol. 2007;68:384-91.

85. Datta S, Sarvetnick NE (2008) IL-21 Limits peripheral lymphocyte numbers through T cell homeostatic mechanisms. PLoS ONE 3:e3118.

86. Morton NE. Methods in Genetic Epidemiolgy. New York: Karger 1983.

87. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS; Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. Nat Genet. 2009 Jun;41(6):703-7.

88. Komer A, Arato A, Madaasy L, Rideg O. Increased risk of other autoimmune disorders in children with type I diabetes mellitus. *JPEM.* 2002;15:1064

89. Jin P, Huang G, Lin J, Yang L, Xiang B, Zhou W, Zhou Z. . High titre of antiglutamic acid decarboxylase autoantibody is a strong predictor of the development of thyroid autoimmunity in patients with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults. Clin Endocrinol (Oxf). 2011 May;74(5):587-92.

90. Ergür AT, Oçal G, Berberoğlu M, Adıyaman P, Sıklar Z, Aycan Z, Evliyaoğlu O, Kansu A, Girgin N, Ensari A. Celiac Disease and Autoimmune Thyroid Disease in Children with Type 1 Diabetes Mellitus: Clinical and HLA-Genotyping

Results. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2010 Dec;2(4):151-4. Epub 2010 Nov 3

91. Lahner E, Annibale B. Pernicious anemia: new insights from a gastroenterological point of view. World J Gastroenterol. 2009;15:5121–5128.

92. Cattan D. Pernicious anemia: What are the actual diagnosis criteria? World J Gastroenterol. 2011 Jan 28;17(4):543-4.

93. de Graaff LC, Martín-Martorell P, Baan J, Ballieux B, Smit JW, Radder JK. Long-term follow-up of organ-specific antibodies and related organ dysfunction in type 1 diabetes mellitus. Neth J Med. 2011 Feb;69(2):66-71.

ANEXO 1: Aprovação da Comissão de Ética – CAPPesq para o referido trabalho

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.09.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **836/06** , intitulado: **"Estudo da região promotora do gene da Interleucina (IL-21) e do poliformismo do gene Tirosina Fosfatase, tipo não receptor 22 (PTPN22):Associação com auto-anticorpos em pacientes portadores de Diabetes Mellitos Tipo 1A"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Dr(a): Maria Elizabeth Rossi da Silva**
Pesquisador(a) Executante:**Dr(a): Débora Teixeira de Oliveira Mainardi-Novo**

CAPPesq, 13 de Setembro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 - e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
fê

ANEXO 2: Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos pacientes (ou responsáveis) com DM1A e controles

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

9. Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: Estudo do Gene da IL-17 A e de seu receptor em células mononucleares periféricas em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 autoimune.

Eu discuti com a Dra.Maria Elizabeth Rossi da Silva, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ___/___/___

Assinatura da testemunha Data ___/___/___

1. Este estudo ajudará no conhecimento dos genes que favorecem o aparecimento de diabetes e outras doenças autoimunes. Doenças autoimunes são aquelas nas quais o próprio organismo agride e destrói seus órgãos e tecidos. Também serão dosados os anticorpos produzidos contra o pâncreas, articulações, tiróide, intestino, fígado e músculos. Parte do sangue colhido será armazenado em Freezer para estudo futuro de outros genes que possam favorecer o aparecimento de diabetes tipo 1;
2. Será feita uma coleta de sangue pela veia superficial do antebraço com agulha e seringa descartáveis (25 mL). Este sangue fará parte do material da pesquisa;
3. Apenas uma coleta de sangue por veia superficial será realizada durante o trabalho;
4. Desconfortos e riscos esperados: desconforto, dor e hematoma no local da coleta de sangue;
5. Não há benefício direto para o participante: Este estudo ajudará no conhecimento dos genes relacionados aos diabéticos no Brasil e na definição das pessoas com risco de desenvolverem a doença, que poderão vir, no futuro, a ser submetidas a tratamento para prevenir diabetes;
6. Não existe neste trabalho outro procedimento que possa substituir a coleta de sangue mas como vantagem todos os participantes receberão: orientações no tratamento do diabetes, incluindo alimentação, atividade física, medidas de glicemia de ponta de dedo e uso de insulina para os pacientes com diabetes;
7. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra.Maria Elizabeth Rossi da Silva, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 –sala 3324, Telefone(s) 3061-7259 (FMUSP). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;
8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

DADOS SOBRE A PESQUISA

1-TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo do Gene da IL-17 A e de seu receptor em células mononucleares periféricas em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 autoimune.

2-PESQUISADOR: Dra.Maria Elizabeth Rossi da Silva

CARGO/ FUNÇÃO:Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA Nº 19.981

UNIDADE DO HCFMUSP: Endocrinologia e Metabologia – LIM 18 - Depto. De Clínica Médica.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 03 anos