CINTIA SEMZEZEM

Variantes nos genes dos receptores das interleucinas IL- 17A e IL-21 em pacientes com diabete melito autoimune

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

Orientadora: Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2017

CINTIA SEMZEZEM

Variantes nos genes dos receptores das interleucinas IL- 17A e IL-21 em pacientes com diabete melito autoimune

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

Orientadora: Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Semzezem, Cintia
Variantes nos genes dos receptores das interleucinas IL- 17A e IL-21 em pacientes com diabete melito autoimune / Cintia Semzezem. -- São Paulo, 2017.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Maria Elizabeth Rossi da Silva.

Descritores: 1.Receptores de interleucina-17 2.Receptores de interleucina-21 3.Diabetes mellitus tipo 1 4.Autoimunidade 5.Polimorfismo genético 6.Predisposição genética para doença

USP/FM/DBD-147/17

Dedico à minha família, com amor, admiração e gratidão pela compreensão, carinho e apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, obrigada por me incentivar! Por me mostrar sempre que a paciência é importantíssima para as conquistas da vida! Por me mostrar como é ser honesto e como respeitar as pessoas.

Ao meu companheiro de vida, Marco, que me apoiou e me apoia em todos os meus projetos, estando sempre ao meu lado, com seu carinho e dedicação, sempre me incentivando!

Ao meu filho Pedro, minha preciosa jóia, que me ensinou o que é o amor incondicional!

A Margarete, ao seu Roberto e ao Maicon, por cuidarem tão bem do Pedro! Com tanto amor e carinho!

A minha irmã Priscila e ao meu sobrinho Augusto, que muitas vezes me fiz ausente.

A todos da minha família que compreenderam o que tudo isto significa para mim.

A Dra Beth, pela orientação e compreensão neste estudo, que foram importantes para elaboração e finalização do trabalho.

Aos companheiros Marcia Regina, Rosa Fukui, Marcia Monteiro, Adriana Rosa, Rodolfo Batista e Pedro Flora, pessoas que conheci nesta caminhada, obrigada pelos momentos que compartilhamos de emoções, conquistas e angústias!

Aos demais colegas do LIM18, Maysa, Bruno, Dra Rosa, Fátima e Greci.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Biologia, em especial a Prof Maria Rita e ao Luciano, por colocar à disposição a área experimental e o laboratório.

A todos os amigos que me apoiaram nesta caminhada, vocês foram fundamentais para que eu não desistisse.

Aos colegas do LIM18, que de alguma forma contribuíram.

“Na vida nada deve ser temido,
apenas compreendido”
Marie Curie (1867-1834)

NORMATIZAÇÃO UTILIZADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periodicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE ABREVIATURAS
LISTA DE SÍMBOLOS
RESUMO
ABSTRACT

1 **INTRODUÇÃO** 23
1.1 Diabete Melito Autoimune 23
1.2 Epidemiologia 23
1.3 Genes associados ao DM1A 24
1.4 Sistema imunológico 25
1.4.1 Imunidade celular 25
1.4.2 Imunidade humoral 26
1.4.3 Vias de ativação do sistema imunológico 27
1.5 Interleucinas e seus receptores 28
1.5.1 Interleucina 17 e seu receptor 29
1.5.2 Interleucina 21 e seu receptor 31
2 **JUSTIFICATIVA** 33
3 **OBJETIVOS** 34
4 **MÉTODOS** 35
4.1 Casuística 35
4.1.1 Pacientes 35
4.1.2 Controles 35
4.2 Extração de DNA 36
4.3 Seleção dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) 36
4.4 Estudo Molecular 37
4.5 Avaliação Bioquímica 37
4.5.1 Glicemia 37
4.5.2 Hemoglobina Glicada 38
4.5.3 Anticorpos Pancreáticos 38
4.5.4 Anticorpos extrapancreáticos 38
4.6 Análise Estatística 39

4.6.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg 39
4.6.2 Modelos Genéticos avaliados 39
4.6.2.1 Modelo de Genótipos. 40
4.6.2.2 Modelo Dominante 40
4.6.2.3 Modelo Recessivo 40
4.7 Associações dos polimorfismos com os anticorpos pancreáticos e extrapancreáticos 40
5 **RESULTADOS** 41
5.1 Resultados clínicos e laboratoriais 41
5.2 Resultados Moleculares 44
5.2.1 Frequências dos genótipos das variantes de *IL17RA*, *IL21R* e *cadeia gama comum* 44
5.3 Susceptibilidade ao DM1A conferida pelos genes *IL17RA* e *IL21R* 46
5.4 Gene do receptor da IL17A e presença de autoanticorpos. 49
5.4.1 Autoanticorpos pancreáticos 49
5.4.2 Autoanticorpos extrapancreáticos 52
5.5 Gene do receptor da IL21 e autoanticorpos 54
5.5.1 Autoanticorpos pancreáticos 54
5.5.2 Autoanticorpos extrapancreáticos 55
6 **DISCUSSÃO** 59
7 **CONCLUSÕES** 64
8 **REFERENCIAS** 65
9 **ANEXOS** 70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do receptor da interleucina IL17A (a) e localização do gene *IL17RA* (b).....30

Figura 2. Esquema do receptor da interleucina IL21(a) e localização do gene *IL21R* no cromossomo 16 (b).....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais da população avaliada 42

Tabela 2 - Frequência das variantes dos genes *IL17RA, IL21R* e Cadeia Gama Comum selecionadas para o estudo 43

Tabela 3 - Frequências genotípicas, frequência do alelo raro e resultados do Equilíbrio de Hardy-Weinberg das variantes de *IL17RA*, *IL21R* e *Cadeia Gama Comum* nos grupos DM1A e controle.....45

Tabela 4 - Associação das variantes do gene *IL17RA* com a susceptibilidade para o DM1A 47

Tabela 5 - Associação das variantes do gene *IL21R* com a susceptibilidade para o DM1A 48

Tabela 6 – Associação dos polimorfismos de *IL17RA* com os anticorpos pancreáticos na amostra total de pacientes com DM1A.....50

Tabela 7 – Associação entre o polimorfismo rs5748863 e o anticorpo antitirosina-fosfatase (anti- IA2) na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo recessivo 51

Tabela 8 - Associação entre o polimorfismo rs879577 e o anticorpo anti-IA2 na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo dominante 51

Tabela 9 – Associação dos anticorpos extrapancreáticos com as variantes do gene do receptor da interleucina *IL17A* em pacientes com DM1A.....53

Tabela 10 – Associação das variantes de *IL21R* com os anticorpos pancreáticos na amostra total de pacientes com DM1A.....54

Tabela 11 – Associação dos anticorpos extrapancreáticos com as variantes do gene *IL21R* em pacientes com DM1A 56

Tabela 12 – Associação entre a variante rs2214537 e a frequência do anticorpo anticélula parietal na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo dominante.....57

Tabela 13 – Associação entre a variante rs3093315 e a frequência do anticorpo TRAb na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo dominante 57

Tabela 14 – Associação entre o rs2285452 e a frequência do anticorpo anti-endomísio na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo dominante.....58

Tabela 15 – Associação entre o polimorfismo rs2285452 e o anticorpo anti-TPO na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo recessivo 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-CP	Anti-célula parietal
Anti-Endom	Anti-endomísio
Anti-TG	Anti-tireoglobulina
Anti-TPO	Anti-tireoperoxidase
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
C	Citosina
CTLA-4	Antígeno 4 associados ao linfócito T citotóxico
DM1A	Diabete Melito tipo 1 Autoimune
DNA	Acido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Acido diaminoetanotetracetico
FR	Fator reumatoide
G	Guanina
GAD65	Enzima descarboxilase do acido glutâmico
HbA1c	Hemoglobina glicada
HLA	Antígeno leucocitário humano
HLA-DR3/-DR4	Antígeno leucocitário humano (alelo especifico)
HPLC	Cromatografia liquida de alta eficiência
IA2	Tirosina fosfatase
IAA	Anticorpo antiinsulina
IC	Intervalo de confiança
ICA	Antiilhotas de langherhans citoplasmático
IDDM1	*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 1*
IDDM2	*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 2*
IL	Interleucina
IL17	Interleucina 17
IL17RA	Receptor da interleucina 17A
IL21	Interleucina 21
IL21R	Receptor da interleucina 21
INS	Insulina
LES	Lupus eritematoso sistêmico

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NK	Células exterminadoras “natural Killer”
NOD	Linhagem de camundongo não obeso diabético
OR	Razão de chances “ Odds ratio”
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Primer F	Iniciadores sense (Forward)
Primer R	Iniciadores antisense (Reverse)
PTPN-22	Não receptor da proteína tirosina fosfatase tipo 22

LISTA DE SIMBOLOS

T	Timina
T CD4+	Linfócitos T CD4+
T CD8+	Linfócitos T CD8+
Taq	*Thermus aquaticus* enzima polimerase
TCR	Receptor de células T
TH	T Helper
TRAb	Anti receptor do TSH
Treg	Células T reguladoras
UTR	Região não traduzida
A	Alfa
B	Beta
Γ	Gama
=	Igual
>	Maior
<	Menor
≤	Menor ou igual
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
N	Numero
dL	Decilitro
µL	Microlitro
mL	Mililitro
Ng	Nanograma
Mg	Miligrama
U	Unidade
nU	Nanounidade
M	Molar
mM	Milimol
pMol	Picomol
MgCL2	Cloreto de magnésio
Na	Sódio

I125	Iodo 125
ºC	Grau Celsius

RESUMO

Semzezem C. **Variantes nos genes dos receptores das interleucinas IL-17A e IL-21 em pacientes com diabete melito autoimune** [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Diabete Melito tipo 1A (DM1A) é uma doença autoimune resultante da interação de fatores ambientais, alterações imunológicas e predisposição genética. Decorre da perda da tolerância aos antígenos das células beta pancreáticas e ativação do sistema imunológico, notadamente dos linfócitos T e B. A via linfocitária T helper 17 está fortemente associada ao processo inflamatório denominado insulite, que resulta na destruição das células beta pancreáticas, levando à perda gradativa da produção de insulina e à instalação do DM1A. A via T helper 17 é regulada pelas interleucinas IL-17, IL-21, IL-23 e IL-27, que também atuam na agressão autoimune. Neste estudo nós avaliamos a importância dos receptores da IL-21 (IL-21RA) e da IL-17 (IL-17RA) na susceptibilidade ao DM1A e nas suas manifestações autoimunes (autoanticorpos) em 631 pacientes portadores de DM1A (24.6 ± 13.0 anos) comparados com 652 controles saudáveis (28.5 ± 11.4 anos). Não há dados prévios na literatura. As variantes selecionadas dos genes do *IL-17RA* (n=4), do *IL-21R* (n=5) e da *cadeia gama comum* (n=1) foram genotipadas através da metodologia Vera Code, Golden Gate (Illumina, EUA). Os autoanticorpos circulantes anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD65), anti-tirosina fosfatase (anti-IA2), anti-peroxidase (anti-TPO) e anti-tireoglobulina (anti-TG) foram dosados por radioimunoensaio, o anti-transportador de zinco 8 (anti-ZnT8) por ELISA, o anti-célula parietal por imunofluorescência direta e o anti-receptor de TSH (TRAb) por ensaio radiorreceptor, marcado com iodo radioativo. As frequências dos genótipos das variantes foram testadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e as associações genotípicas, pelos testes do qui-quadrado e exato de Fisher. Estes foram ajustados para as covariáveis (idade, sexo, cor autorreferida e duração do diabete) na análise de regressão logística binária. Obtivemos os seguintes resultados para o gene *IL17RA:* a variante rs2241049 (genótipos AG/GG) foi associada à susceptibilidade para o DM1A (OR=1,42; IC95%=1,11-1,81; p=0,005), enquanto a variante rs879577 à proteção ao DM1A (genótipo AA: OR=0,61; IC95%= 0,4 - 0,93; p=0.021) e à menor frequência do anticorpo anti-IA2 (AA/AG; OR=0,67, IC95%=

0,45-0,99; p=0.043). O genótipo GG de rs5748863 foi relacionado à menor frequência dos autoanticorpos anti-IA2 (OR=0,52, IC95%= 0,32- 0,86; p=0.010). Em relação ao gene *IL21R*, os genótipos GC/CC de rs7199138 foram relacionados à susceptibilidade ao DM1A (OR= 1,33; IC95%= 1,05-1,68; p= 0,018). As variantes rs2214537(CG/GG) e rs2285452 (AG/AA) foram associadas à menor frequência dos autoanticorpos anti-célula parietal (OR=0,24; IC95%= 0,09-0,59; p<0.001) e anti-endomísio (OR=0,17; IC95%= 0,04-0,8; p=0.025), respectivamente. As variantes rs3093315 (TG/TT) e rs2285452 (AA) condicionaram maior frequência de TRAb (OR=5,89; IC95%=1,26-27,61; p=0.024) e anti-TPO (OR=2,38; IC95%= 1,1-5,13; p=0.028), respectivamente. Nossos resultados sugerem que variantes dos genes *IL17RA* e *IL21R* estão associadas à fisiopatologia do DM1A e à expressão de autoanticorpos pancreáticos e extrapancreáticos.

Descritores: receptores de interleucina-17; receptores de interleucina-21 ; diabetes mellitus tipo 1; autoimunidade; polimorfismo genético; predisposição genética para doença

ABSTRACT

Semzezem C. **Variants of the genes of the receptors of the interleukins IL-17A and IL-21 in patients with autoimmune diabetes mellitus** [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is an autoimmune disease resulting from the interaction of environmental factors, immunological changes and genetic predisposition. It results from the loss of tolerance to pancreatic beta cell antigens and to the activation of the immune system, notably T and B lymphocytes. The T helper-17 pathway is strongly associated with the inflammatory process called insulitis, which results in pancreatic beta cells destruction, leading to the gradual loss of insulin production and to the manifestation of T1D. The T helper 17 pathway is regulated by the interleukins IL-17, IL-21, IL-23 and IL-27, which also act in the autoimmune aggression. In this study we evaluated the importance of the receptors of IL-21 (IL-21RA) and IL-17 (IL-17RA) genes in the susceptibility to T1D and its autoimmune manifestations (autoantibodies) in 631 patients with DM1A (24.6 ± 13.0 years) , compared with 652 health controls (28.5 ± 11.4 years).There is no previous data in the literature. The selected variants of the *IL-17RA* (n = 4), *IL-21R* (n = 5) and of the *common gamma chain* (n = 1) genes were genotyped using the Vera Code methodology, Golden Gate (Illumina, USA). The autoantibodies anti-decarboxylase of glutamic acid (anti-GAD65), anti-tyrosine phosphatase (anti-IA2), anti-peroxidase (anti-TPO) and anti-thyroglobulin (anti-TG) were measured by radioimmunoassay, anti zinc transporter 8 (Anti-ZnT8) by ELISA, anti-parietal cell by direct immunofluorescence and anti-TSH receptor (TRAb) by radiolabeled radioiodine receptor assay. The frequencies of the genotypes of the variants were tested by Hardy-Weinberg Equilibrium and the genotypic associations were performed by the chi-square and Fisher's exact tests. These were adjusted for the covariates (age, gender, self-reported color and diabetes duration) in binary logistic regression analysis.We obtained the following results for *IL-17RA* : the rs2241049 variant (AG/GG genotypes) was associated with susceptibility to T1D (OR = 1,42; CI65%= 1,11-1,81; p = 0,005), while the rs879577 variant to T1D protection (genotype AA: OR = 0,61; CI95%= 0,4 - 0,93; p = 0,021) and to lower anti-IA2 frequency (AA/AG; OR = 0,067; CI95%=0,45-0,99; p=0,043). Further, the GG genotype of rs5748863 variant was related to lower frequency of the autoantibody anti-IA2 (OR= 0,52; CI95%= 0,32- 0,86; p= 0,010). Regarding *IL21R*, the GC / CC genotypes of rs7199138 were related to susceptibility to T1D (OR = 1,33; CI95%= 1,05-1,68; p =

0,018). The variants rs2214537 (CG/GG) and rs2285452 (AG/AA) were associated with lower frequency of parietal cell (OR=0,24; CI95%= 0,09-0,59; p<0,001) and anti-endomysial autoantibodies (OR=0,17; CI95%= 0,04-0,8; p=0,025), respectively. The rs3093315 (TG/TT) and rs2285452 (AA) variants were related to higher frequency of TRAb (OR=5,89; CI95%= 1,26-27,61; p=0,024) and anti-TPO (OR=2,38; CI95%= 1,1-5,13; p=0,028), respectively. Our results suggest that variants of the IL17RA and IL21R genes are associated with the pathophysiology of T1D and the expression of pancreatic and extra-pancreatic autoantibodies.

Descriptors: receptors, interleukin-17; receptors, interleukin-21; diabetes mellitus, type 1; autoimmunity; polymorphism, genetic; genetic predisposition to disease

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabete Melito Autoimune

O Diabete Melito tipo 1 Autoimune (DM1A) é uma doença crônica, de etiologia multifatorial. A interação de fatores ambientais, predisposição genética e alterações imunológicas resulta na destruição das células beta pancreáticas, produtoras de insulina, por um processo inflamatório denominado insulite. Esta destruição pode ser lenta e gradual, principalmente nos adultos, ou rápida e intensa em crianças e adolescentes, levando à necessidade de tratamento permanente com insulina exógena.[1,2]

O diagnóstico do DM1A se dá pela presença de autoanticorpos contra antígenos pancreáticos e níveis elevados de glicose. DM1A é associado a outras doenças autoimunes, como: doença autoimune tireoidiana e doença celíaca, que são caracterizadas por autoanticorpos órgão- específicos relacionados com os mesmos determinantes genéticos. Tais anticorpos são importantes na detecção da autoimunidade antes mesmo da manifestação clínica.[3]

1.2 Epidemiologia

Pacientes com DM1A tem alto risco de morbidade e mortalidade, o que reduz a qualidade e expectativa de vida. O progresso no tratamento do diabetes melhorou as taxas de sobrevivência, embora a expectativa de vida continue a ser menor que a de indivíduos não diabéticos.[4,5]

A ausência de dados nacionais sobre a prevalência e tratamentos adequados em pacientes DM1A levou à condução do estudo *Brazilian Type 1 Diabetes Study Group* (BrazDiab1SG), buscando fornecer dados atuais e precisos. O BrazDiab1SG inclui grande amostragem representativa da distribuição de DM1A na população jovem brasileira. Abrange pacientes com ampla gama de origens raciais, de todas as regiões geográficas do país, obtidos do protocolo de recrutamento padrão uniforme, em todos os centros participantes. A maioria dos pacientes foi diagnosticado antes dos 15 anos de idade e, do total da amostragem, 56% eram do sexo feminino e

57,1% auto referidos brancos, com idade média de diagnóstico de 21,1 ± 11,7 anos e duração da doença de 9,6 ± 8,1 anos (<1 a 50 anos).[6]

Irmãos de crianças com DM1A diagnosticado antes dos 5 anos de idade têm risco três a cinco vezes maior de DM em comparação com os irmãos de crianças diagnosticadas entre 5 e 15 anos de idade[7]. Diabete com início antes dos 5 anos de idade é um marcador de alto risco familiar e sugere papel importante dos fatores genéticos. A prole de mães afetadas têm risco de 2% a 3%, enquanto a dos pais afetados, de 7% de desenvolver DM1A.[8] E esses são superiores da população geral (0,3%). Em gêmeos monozigóticos, a concordância para DM1A chega a 50% e, entre irmãos, a 7%[9,10]

1.3 Genes associados ao DM1A

A utilização de *Genome-wide association study* (GWAS) nos estudos em humanos, associada aos recursos atualizados de genotipagem e melhor conhecimento do genoma humano, permitiu identificar mais de 50 genes envolvidos no desenvolvimento do DM1A(11), subdividos em três categorias: função imunológica, expressão de insulina e função da célula beta pancreática.[12]

A principal contribuição genética para o DM1A está na região do genoma onde estão localizados os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade. Essa região é a mais importante com relação à resposta imunológica, à infecção e à autoimunidade. Nos humanos, ela é chamada de Complexo de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), por sua descoberta ter ocorrido, em inúmeros indivíduos, por causa de diferenças em seus leucócitos.[13]

O complexo HLA, localizado no braço curto do cromossomo 6 (p21.3), contém o *locus* diabetogênico numero 1 (*IDDM1*). Abrange um conjunto de cerca de 200 genes, fisicamente agrupados em três regiões diferentes, chamadas de classe I, II e III. Os genes HLA-A, -B e –C codificam as moléculas MHC de classe I, de distribuição universal, e os genes HLA-DR, -DQ e –DP, codificam as moléculas de classe II, expressas em células do sistema imunológico, como: monócitos,

macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B ativados, que atuam no processamento de proteínas extracelulares.[7–9]

Os genes de classe III, localizados entre os genes de classe I e II não codificam moléculas HLA e sim outras de relevância imunológica.[12]

Os alelos HLA de classe II mostram a associação mais forte com DM1A. O maior risco é conferido pelos haplótipos *-DRB1 * 0401-DQB1 *0302* e *DRB1 * 0301-DQB1 * 0201*, enquanto o *-DRB1 * 1501 -DQA1 * 0102-DQB1 * 0602* oferece proteção à doença. As moléculas HLA de classe I também parecem influenciar a susceptibilidade para DM1A, independentemente das de classe II.[10]

Apesar de 90-95% das crianças com DM1 apresentarem um ou ambos haplótipos de susceptibilidade, apenas 5% ou menos das pessoas com susceptibilidade genética conferida pelo HLA realmente desenvolve a doença. Aproximadamente 40-50% do agrupamento familiar em DM1A é atribuído às variações alélicas na região do HLA. O risco genético restante é composto de vários genes, cada um com pequeno impacto individual sobre a susceptibilidade.[10]

A associação entre DM1A e outras doenças autoimunes, tais como a doença tireoidiana, a doença celíaca, e a gastrite autoimune está bem estabelecida.[14] O agrupamento destas doenças autoimunes está relacionado com genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) comuns entre elas.[7,8]

1.4 Sistema imunológico

1.4.1 Imunidade celular

O estágio inicial do DM1A é marcado pelo processo inflamatório denominado insulite. Nesse processo de destruição das células produtoras de insulina, as células do sistema imunológico, como os monócitos, macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK) , linfócitos T e linfócitos B se infiltram, resultando na destruição lenta e gradual das células beta.[2]

Os linfócitos são células responsáveis pela resposta imunológica especifica, ou seja, reconhecem e diferenciam antígenos. São subdivididos em linfócitos B (implicados na produção de anticorpos) e linfócitos T (participantes da resposta celular especifica). A apresentação dos auto antígenos presentes nas células beta para os linfócitos T CD4+, através dos macrófagos e células dendríticas, marca o primeiro evento de autoimunidade no DM1A.

Com a ativação dos macrófagos, são produzidas citocinas que induzem a migração celular e estimulam outros tipos de células a secretarem radicais livres, tóxicos para as células beta. Na insulite, esse processo ocorre com mais intensidade nas ilhotas que têm células beta metabolicamente ativas. Os linfócitos T CD8+ são as células predominantes, e após o reconhecimento dos autoantígenos pancreáticos, levam à destruição das células beta por citólise, com a participação de perforinas e granzimas, e por apoptose. Assim, os macrófagos e os linfócitos T CD4+ e CD8+ atuam em conjunto na destruição das células beta[2,15]

1.4.2 Imunidade humoral

Os principais marcadores humorais da agressão às células beta pancreáticas são os autoanticorpos:

Antienzima descarboxilase do acido glutâmico (anti-GAD65), que está associado a outras doenças autoimunes. A sua presença não resulta necessariamente na progressão da doença.

Antiproteína de membrana com homologia às tirosina-fosfatases ou auto antígeno 2 do insulinoma (Anti-IA2), é frequente em indivíduos jovens e sinaliza rápida progressão para o diabete.

Antitransportador do zinco 8 (Anti-ZnT8), complementa os anticorpos já estabelecidos como IAA, GAD65 e IA2A no diagnóstico do diabete. ZnT8 é uma proteína de membrana dos grânulos das ilhotas recentemente identificada como um auto antígeno no DM1A.

Anti-insulina (IAA): que ocorre frequentemente em crianças, principalmente do sexo masculino. Em adultos, é pouco frequente e tem baixa sensibilidade diagnostica. É encontrado no soro de pacientes usuários de insulina, não servindo como marcador nestes casos.

Anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático (ICA), é um anticorpo da classe IgG, policlonal, que não é dirigido contra um antígeno especifico das células beta, mas a uma ou mais estruturas celulares simultaneamente, como GAD65, IA2 e outros antígenos[7,8]

1.4.3 Vias de ativação do sistema imunológico

A ativação do sistema imunológico pode se dar através de vários agentes, como: vírus Coxsackie B e o da rubéola, toxinas (pesticidas e nitratos), reduzido número de infecções (Teoria da Higiene), deficiência de vitamina D, introdução precoce de leite de vaca ou abrupta de cereais.

Quando ocorre o desequilíbrio nos mecanismos de tolerância aos antígenos próprios, responsável pela insulite, as células T CD4+ ativadas, que participam deste processo, determinam reações inflamatórias e secreção de citocinas como Interleucina 1 (IL1), interferon gama (IFN-gama) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), causando a morte das células beta pancreáticas (imunidade celular). Essas células também funcionam como células auxiliares ativadoras das células T CD8 e linfócitos B produtores de anticorpos (imunidade humoral)[1]

As células T CD4+ virgens se diferenciam na dependência do antígeno que lhes é apresentado e do ambiente de citocinas, e ganham várias funções no processo de ativação do sistema imunológico, sendo classificadas de acordo com as citocinas produzidas. A via T helper 1 (Th1) sintetiza IFN-gama, induzindo reações de hipersensibilidade tardia, ativa macrófagos e é importante na defesa contra patógenos intracelulares. A via Th2, produz IL4, IL5 e IL13 e é eficiente na resposta imune humoral, desencadeando a produção de imunoglobulinas e inflamação eosinofílica, respostas importantes no combate aos patógenos extracelulares.[16]

As citocinas envolvidas nas vias Th1 ou Th2 direcionam para o desenvolvimento de sua respectiva via, inibindo a expressão do padrão oposto. Deste modo, uma vez polarizada a resposta imunológica para a via Th1, a Th2 é inibida, e vice-versa. Isso acontece devido à regulação do nível de receptores de membrana, da expressão diferencial de fatores de transcrição e de mudanças epigenéticas.

As células T reguladoras (Treg) tem como função a prevenção de doenças autoimunes, e precisam ser primeiramente ativadas pelas células apresentadoras de antígenos para se tornarem supressoras, ou seja, sua ativação é antígeno especifica[17]

Buscando compreender os mecanismos imunológicos responsáveis pelas lesões teciduais em diversas doenças, estudos em linfócitos evidenciaram as células T helper 17, expandindo o conhecimento sobre a diferenciação celular na cascata imunológica. Essas células são originadas sob condições de polarização diferentes das células Th1 ou Th2. A Th17 é uma via independente, definida após a identificação da citocina IL6 e do fator transformador de crescimento (TGF-beta), como moléculas chaves no direcionamento das células T CD4+ virgens para a linhagem Th 17[17,18]

1.5 Interleucinas e seus receptores

As citocinas são uma família de proteínas que medeiam muitas respostas da imunidade inata e adaptativa, e são produzidas por várias células em resposta a estímulos inflamatórios.

Na família das citocinas encontram-se as interleucinas, que são proteínas de baixo peso molecular, produzidas por leucócitos, que se ligam aos receptores de superfície celular e atuam de forma autócrina e parácrina nos próprios leucócitos, induzindo fatores que modificam o programa de diferenciação celular (seleção natural, proliferação, maturação, indução ou proteção contra apoptose) das células alvos.[8]

1.5.1 Interleucina 17 e seu receptor

As células Th17, cujo nome advém da citocina que produzem, secretam ainda outras citocinas: a IL21, a IL22, o TNF-alfa e a IL6. [1,16]. São altamente pró-inflamatórias e específicas contra patógenos, mas também contra antígenos próprios em vários modelos de autoimunidade[19–21], em humanos e em animais, tais como: artrite reumatoide, lupus eritematoso sistêmico, psoríase, doenças inflamatórias intestinais e encefalomielite experimental autoimune, e nas respostas imunes alérgicas especificas.[22]

As células Th17 produzem a IL21, que funciona como reguladora autócrina da produção da IL17, promovendo e mantendo a linhagem Th17. Deficiência de IL21 inibe a produção de células Th17 e confere proteção a algumas doenças autoimunes. A IL23 é outra citocina com efeitos pró-inflamatórios, produzida por macrófagos e células dendríticas, e que também participa na diferenciação e manutenção das células Th17. Ela atua na proliferação de célula produtoras de IL17, agindo em células de memória, tendo um importante papel no aumento e na manutenção das células Th17.[22,23]

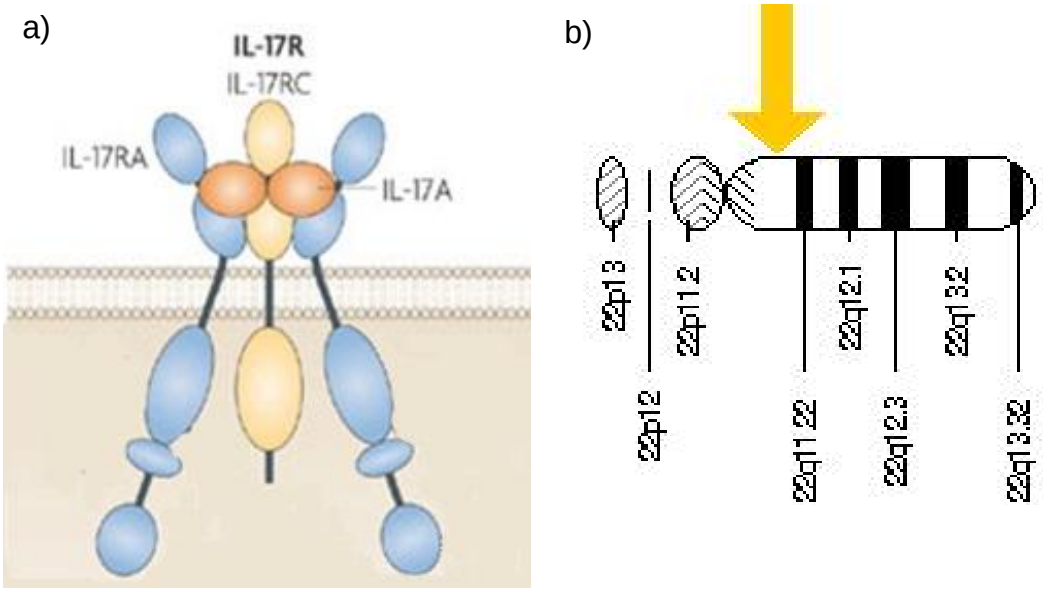
Em animais, o diabete induzido com injeções de streptozotocina e IL23 estava associado à apoptose das células beta e à expressão de TNF-alfa, IL18, INF-y e IL17A, sendo a concentração de IL17A relacionada ao grau de lesão das células beta. Além disso, as injeções de streptozotocina aumentavam os níveis circulantes de IL17A.[24] Há evidencia de que a IL17A é expressa no pâncreas de camundongos *non obese diabetes* (NOD) durante a evolução do diabete e que a indução de produção de IFN-gama reduz as células Th17 e a produção de IL17, restabelecendo a normoglicemia.[25] A inibição da célula T helper 17 previne o desenvolvimento de diabete em camundongos NOD.[26]

Vários polimorfismos nos genes da família da IL17 têm sido associados ao risco para o desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamatórias e infecciosas, e até mesmo à susceptibilidade para neoplasias complexas, mas há poucos relatos sobre os efeitos das variantes no eixo IL17 e seu receptor IL17RA no DM1A. Em humanos, A IL1 beta e o IFN-gama aumentam a expressão de receptores de IL17A

nas ilhotas pancreáticas, num processo mediado por NF-kB (fator nuclear kB), responsável pela transcrição que regula a expressão de vários genes ligados à resposta imunológica e inflamatória, e STAT1 (transdutor de sinal e ativador da transcrição 1), que media as respostas imunológicas de IFN-gama.[27]

O receptor da IL17A é multimérico, composto por duas subunidades de L17RA e uma IL17RC. O gene *IL17RA e*stá localizado no cromossomo 22 (q11.1)[28] (Figura 1.a e b) e codifica uma glicoproteína de membrana que se liga com baixa afinidade à interleucina 17A.[29]

Figura 1. Esquema do receptor da interleucina IL17A (a) e localização do gene *IL17RA* (b).



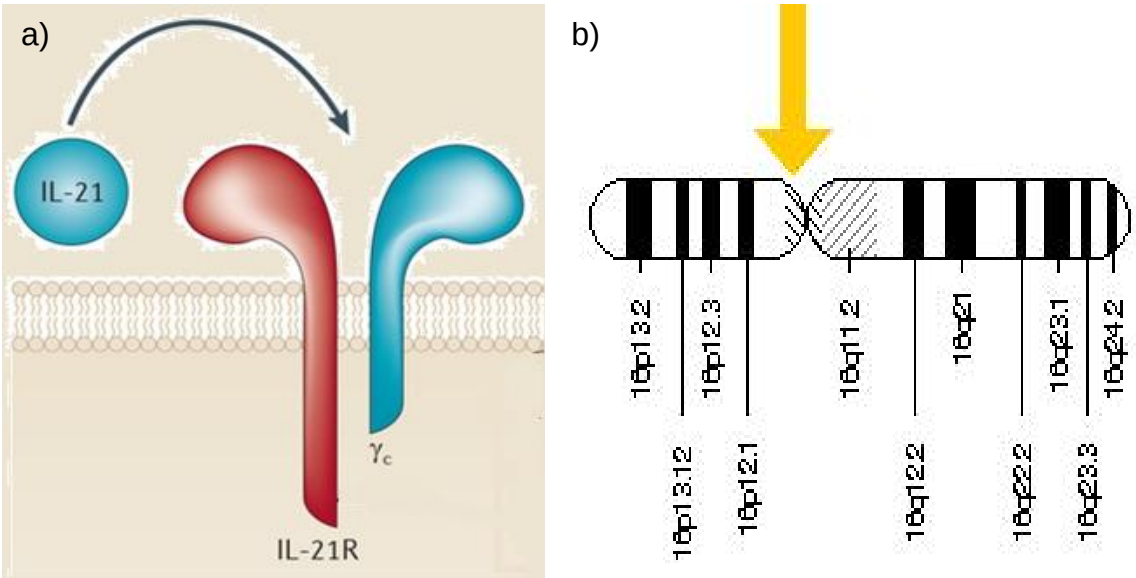
a) Fonte: http://www.nature.com/nri/journal/v9/n8/fig_tab/nri2586_F3.html b) Fonte: http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/IL17RA.jpeg

Dados associando a IL17A e seu receptor com o DM1A em humanos ainda são escassos; a via Th17 parece desempenhar um papel importante na doença, porém seus mecanismos ainda não são completamente elucidados, justificando novas pesquisas nesta via e nos seus mecanismos reguladores.

1.5.2 Interleucina 21 e seu receptor

A IL21 é uma interleucina da família das interleucinas com cadeia gama comum, produzida por linfócitos TCD4+ ativados, células Th17 e células NK (30). Atua através da interação com seu receptor IL21R, expresso principalmente em linfócitos T CD4+ e CD8+, mas também em linfócitos B, células NK, células dendríticas, macrófagos e queratinócitos, o que lhe confere espectro de ação muito amplo. Ativa a família das proteínas JAK-quinase (tirosina-quinases intracelulares), sendo que a JAK-1 (janus quinase 1) liga-se ao sítio especifico do receptor da IL21 e a JAK3 (janus quinase 3) liga-se ao receptor gama comum.[31]

Figura 2. Esquema do receptor da interleucina IL21(a) e localização do gene *IL21R* no cromossomo 16 (b).



a) Fonte: http://www.nature.com/nrd/journal/v13/n5/fig_tab/nrd4296_F2.html b) Fonte: http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/IL21R.jpeg

O receptor da IL21 pertence à família dos receptores de citocinas tipo I, forma um complexo heterodimérico com a cadeia gama comum (Figura 2.a), uma subunidade de receptor também compartilhada pelos receptores das interleucinas IL2, IL4, IL7, IL9 e IL15. Este receptor é importante para a proliferação e diferenciação de células T, células B e células NK. A IL21, ligada ao seu receptor, conduz à ativação de múltiplas moléculas de sinalização, incluindo JAK1, JAK3,

STAT1, STAT3. Estudos de *knockout* de um gene semelhante em camundongos sugerem que este gene atua na regulação da produção de imunoglobulina.[8,32]

O receptor da IL21 tem seu gene codificador localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p11) (Figura 2.b) e seus níveis de RNAm elevam-se com a ação da própria IL21[31]. A localização deste receptor é bem diversificada e a sua expressão é diretamente proporcional à da IL21, mas a meia vida desta é curta e, sua quantificação, problemática. [33]

Estudos apontam potencial interação entre a IL21 e IL21R na gênese e progressão de diversas doenças autoimunes [28,34]. Em camundongos NOD há a destruição das células beta por células T ativadas e há um grande número de genes associados com DM1A, em humanos e em camundongos. O loci *IDD3*, situado no cromossomo 4 em humanos e, em camundongos, no cromossomo 3, codifica as interleucinas 2 e 21. Estudos em humanos mostraram associação da região IL2/IL21 (região 4q27) com DM1A e variações dos genes IL21 e IL21R foram associadas à susceptibilidade ao diabete de maneira aditiva.[32]

Contrariando estes dados, em nosso laboratório foi verificada a diminuição da expressão dos receptores da IL21 e da IL17 em linfócitos T CD3+ e CD4+ periféricos em pacientes com DM1A de início recente, ou seja, até seis meses de diagnóstico, quando a autoimunidade ainda está ativa [8,35]. Também não observamos elevação nas concentrações séricas de IL17 e IL23 nestes pacientes quando comparados com controles normais [35], ou polimorfismos nos genes da IL17 [8], IL21 [35]e IL27 [36] que pudessem influir na expressão da via Th17. Por outro lado, verificamos que o haplótipo GG das variantes da IL-23 A (rs11171806 e rs2066808) conferia proteção ao DM1A [37]. Assim, variantes nos receptores da IL17 e da IL21 poderiam estar associados à sua menor expressão em linfócitos T periféricos.

2 JUSTIFICATIVA

A IL17 e a IL21 têm papel crucial no desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T e B e desempenham papel importante contra infecções e na gênese da autoimunidade. Sua expressão tem correlação com inflamação do pâncreas em modelos animais e humanos de diabete autoimune. Alterações genéticas em seus receptores poderiam estar implicadas também nas suas expressões, na susceptibilidade à doença e nas suas manifestações clínicas.

3 OBJETIVOS

Identificar as variantes de relevância nos genes *IL17RA*, *IL21R* e *cadeia gama comum* e sua associação com o DM1A.

Determinar a frequência destas variantes na população com diabete e na população controle, e a interação de eventuais polimorfismos com a expressão de autoanticorpos pancreáticos (anti-GAD65, anti-IA2, anti-ZnT8) e extrapancreáticos (antitireoglobulina, antiperoxidase, anti-endomísio, anticélula parietal, FAN, TRAb), presentes em outras doenças autoimunes associadas ao DM1A.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

No projeto utilizamos material genético de amostras de sangue de portadores de DM1A e de controles normais do Banco de DNA do HCFMUSP. Foi solicitado autorização à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) para utilização de material biológico armazenado. Nº Cappesq: 61042; Projeto: 11.830.

4.1.1 Pacientes

Os pacientes foram selecionados obedecendo aos critérios recomendados pela Sociedade Brasileira de Diabetes[38] para DM1A.

Pacientes com DM1A caracterizados por:

Hiperglicemia grave ou cetoacidose ao diagnóstico;

Início precoce de insulinoterapia;

Presença de um ou mais autoanticorpos pancreáticos positivos e/ou alelos HLA de risco para DM1A;

Fatores de exclusão: Diabete de causa não autoimune.

4.1.2 Controles

Indivíduos com glicemia de jejum e hemoglobina glicada normais e ausência de qualquer doença autoimune ou história familiar de DM1A.

4.2 Extração de DNA

O sangue periférico foi coletado em tubos contendo EDTA e armazenado à -20°C. O DNA genômico foi extraído pela metodologia de *Salting out*.(39) As amostras foram diluídas para a concentração final de 50ng/µL. A seguir foi feita a leitura da absorbância no aparelho NanoDrop, a 260nm e 280nm. Utilizou-se a relação das absorbâncias A260/A280 para avaliar a quantidade do DNA extraído. Para verificar a qualidade, foi feita análise da integridade do DNA em gel de agarose.

4.3 Seleção dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs)

Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único foram selecionados através do banco de dados HapMap (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/) [40]em duas populações, devido à miscigenação na população brasileira:

A. CEPH (*Utah Residents with Northern and Western European Ancestry*)(CEU), amostras de indivíduos com ascendência do norte e oeste da Europa.

B. Yoruba em Ibadan, Nigéria (YRI), amostras de individuos da Nigéria.

Posteriormente, os dados obtidos no HapMap foram analisados através do software Haploview (www.broad.mit.edu/personal/cbaret/haploview/), que é uma ferramenta de bioinformática que identifica os desequilíbrios de ligação em dados genéticos, além de apresentar os "*tag*" SNPs de cada bloco de desequilíbrio de ligação.[41]. Portanto *tag* SNPs são representantes de todos os SNPs dentro de um conjunto designado como haplótipo (bloco) e sua utilização reduz informações redundantes.

Também consideramos nesta escolha as variantes com frequências acima de 10% na população mundial, aquelas citadas na literatura associadas a outras doenças autoimunes ou com influência na função dos receptores, e que fossem comuns para as duas populações CEU e YRI.

Os SNPs selecionados incluíram variantes genéticas localizadas em regiões regulatórias e missenses ou não sinônimas (que alteram o aminoácido codificado). As regiões regulatórias incluíram variantes localizadas upstream ao gene (situadas a 5' do gene em questão, na região promotora); nas regiões 5'-UTR e 3'-UTR, que representam regiões transcritas, porém não traduzidas de um gene e em região intrônica (dentro de um intron, região não codificadora do gene).

4.4 Estudo Molecular

Neste estudo, foi utilizada a Plataforma GoldenGate, tecnologia Veracode (*Illumina, EUA*) para a genotipagem das variantes dos genes dos receptores das Interleucinas IL17A e IL21. Os ensaios foram realizados em microplacas com 96 poços contendo 144 marcadores dentro de cada poço da placa. Esta plataforma permite a avaliação de vários polimorfismos com precisão e rapidez, em grande quantidade de amostras. Entretanto, para este estudo, foram considerados 10 marcadores.[42]

Para a análise do gene da Cadeia Gama Comum foi utilizado o método *TaqMan SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA,*EUA).

4.5 Avaliação Bioquímica

4.5.1 Glicemia

As amostras de sangue para a dosagem das glicemias foram colhidas com o anticoagulante, fluoreto de sódio EDTA. Utilizou-se o ensaio enzimático colorimétrico especifico para glicose: sistema (glicose oxidase-peroxidase), kit comercial LABTEST GOD-ANA (Brasil). Os valores de glicose foram considerados normais entre 70 e 99 mg/dL, no plasma em jejum (Sociedade Brasileira de Diabetes).

4.5.2 Hemoglobina Glicada

O valor da hemoglobina glicada (HbA1c) nas amostras sanguíneas, colhidas em tubos contendo EDTA, foi obtido por Cromatografia Liquida de Alta Eficiência – HPLC (CLAE). Os valores normais foram de 4,1 a 5,7%.

4.5.3 Anticorpos Pancreáticos

As dosagens dos anticorpos anti-GAD65 e anti-IA2 foram realizadas por radioimunoensaio (RSR, UK), onde o antígeno recombinante (GAD65 ou IA2) marcado com I25 foi incubado, à temperatura ambiente (para anti-GAD) e a 4ºC (para anti-IA2) por 16 a 24 horas, com o soro a ser analisado. Os complexos antígeno anticorpo formados foram tratados com suspensão de proteína A. Os valores normais para a nossa população, avaliada em 787 controles normais, considerando 3 desvios-padrão foram: anti-GAD65 ≤ 1,0 UI/mL (coeficientes de variação – CV- intra e interensaio: 3 e 5,5%) e anti-IA2 ≤ 0,8 UI/mL (coeficientes de variação intra e interensaio: 4,3 e 3,4%). Os níveis séricos de ZnT8a foram obtidos pela metodologia ELISA (Kronus, USA), que quantifica 3 autoanticorpos específicos para as variantes: ZnT8RA (Arginina), ZnT8QA (glutamina) e ZnT8WA (triptofano). Valor normal para nossa população < 16 U/mL.CV=8%.

4.5.4 Anticorpos extrapancreáticos

Os anticorpos anticélula parietal foram dosados por imunofluorescência direta em lâminas de microscópio fixadas com tecido da parede do estomago de ratas. Valores de referência: Negativos. O antitireoperoxidase (Anti-TPO) e antitireogobulina (Anti-TG) foram dosados por fluoroimunoensaio indireto com reagentes da AutoDELPHIA. Valores de referencia: <35U/mL.

O anti-endomisio foi dosado por imunofluorescência indireta (IFI) em neutrófilos humanos de sangue periférico. Valores de referencia: Negativos (não reagentes), bem como o fator antinuclear (FAN), em células HEp-2, onde os anticorpos antinucleares reagem imunológicamente como constituintes

macromoleculares do núcleo celular. Os padrões de imunofluorescência foram complementados por testes específicos para a detecção de anticorpos antinucleares por IFI em HEp-2 titulado até 1/1280. Valores de referência: Negativos (não reagente) e o antirreceptor do hormônio estimulador da tireoide (TRAb), foi dosado pelo método de radiorreceptor, marcado com iodo radioativo, reagentes da RSR. Valores de referencia: <8% negativo; 8 a 19% duvidoso; >19% positivo.

4.6 Análise Estatística

4.6.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As frequências alélicas e os genótipos foram calculados por contagem de alelos e o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi testado por meio de teste de $\chi 2$, comparando se as frequências genotípicas/alélicas observadas diferiram dos valores esperados de acordo com o EHW. O EHW foi testado nos grupos DM1A e controle, considerando-se como significativos valores de $p<0,05$.

4.6.2 Modelos Genéticos avaliados

As análises foram realizadas baseando-se em três modelos genéticos para estudos de associação. Considerou-se o alelo polimórfico como o menos frequente na população avaliada, sendo chamado neste estudo de alelo raro.

4.6.2.1 ***Modelo de Genótipos:*** comparamos as frequências dos homozigotos para o alelo mais frequente, heterozigotos e homozigotos para o alelo raro entre os grupos avaliados.

4.6.2.2 ***Modelo Dominante:*** comparação da frequência de homozigotos para o alelo mais frequente em relação aos heterozigotos + homozigotos para o alelo raro entre os grupos DM1A e controle, onde avaliamos se o alelo polimórfico (raro) possui efeito dominante, sendo necessária apenas uma cópia para a manifestação do fenótipo avaliado.

4.6.2.3 ***Modelo Recessivo:*** é a comparação da frequência de homozigotos para o alelo de maior frequência + heterozigotos em relação aos homozigotos para o alelo raro entre os grupos estudados, onde investigamos se o alelo raro é recessivo, sendo necessárias as duas cópias do alelo para manifestar o fenótipo. [43]

Todos os testes estatísticos para os polimorfismos individuais foram realizados utilizando-se o pacote estatístico SPSS® 18.0 e a hipótese nula foi rejeitada com valores de $p<0,05$.

4.7 Associações dos polimorfismos com os anticorpos pancreáticos e extrapancreáticos

Para verificar diferenças das variáveis descritivas entre os grupos DM1A e controle, foram utilizados os testes de $\chi 2$ ou Exato de Fisher. Os riscos dos polimorfismos que foram associados nas análises univariadas, foram estimados pelos valores de Odds Ratio (OR, razão de chances), com intervalo de confiança de 95% (IC 95%), utilizando a regressão logística binária ajustada para as covariáveis: cor autorreferida, duração da doença e sexo. O genótipo homozigoto mais frequente foi considerado como referência nas análises utilizando os Modelos de Genótipo e Dominante, enquanto que a presença do alelo raro foi utilizada como referência no Modelo Recessivo. Valores de OR>1 indicam risco aumentado em apresentar o fenótipo e valores OR<1 indicam proteção em relação ao fenótipo avaliado.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados clínicos e laboratoriais

Avaliamos 1283 individuos, sendo 632 pacientes portadores de DM1A e 651 controles normais. Os pacientes com DM1A tinham idade inferior à da população controle, predomínio do sexo feminino e maior frequência de autorreferidos brancos. Apresentavam glicemia mais elevada e maior frequência dos autoanticorpos anti-GAD65, anti-IA2 e anti-ZnT8. A idade diagnóstico foi de 12,4 anos, bem como a duração da doença (Tabela 1).

Tabela 1. Características clinicas e laboratoriais da população avaliada.

Variáveis		DM1A (N=632)		Controles (N=651)		p
		%	**Média±DP**	**%**	**Média±DP**	
Idade de coleta (anos)		-----	24,6 ± 13,0		28,5 ± 11,4	<0,001*
Duração do diabete (anos)		-----	13,3 ± 10,6		-----	-----
Idade de diagnóstico (anos)		-----	12,3 ± 8,5		-----	-----
Sexo						
	Masculino	42,3		60,5		<0,001*
	Feminino	57,7		39,5		
Cor autorreferida						
	Branca	80,2		63,7		<0,001*
	Não Branca	19,8		36,3		
Glicemia (mg/dL)			189,6 ± 113,7		83.5 ± 9,8	<0,001*
HbA1c (%)			8,4 ± 2,2		5,3 ± 0,5	<0,001*
Anticorpos pancreáticos	Anti-GAD	52,8		1,5		<0,001*
	Anti-IA2	57,5		1,9		<0,001*
	Anti-ZnT8	48,2		2,0		<0,001*
	Anti-célula parietal	8,4		0,8		<0,001*
	Fator antinuclear	21,0		3,0		<0,001*
Anticorpos extrapancreáticos	Anti-endomisio	4,2		0,0		<0,001*
	Antitireoperoxidase	29,5		7,0		<0,001*
	Antitireoglobulina	26,3		9,1		<0,001*
	Antirreceptor do hormônio estimulador da tireoide	6,0		0,3		<0,001*

DM1A: pacientes com diabete melito tipo 1 autoimune; DP: desvio-padrão; N: número de indivíduos; **anti-GAD65: a**nticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65; **anti-Znt8: a**nticorpo antitransportador do zinco 8; **anti-IA2: a**nticorpo antitirosina fosfatase;

Na tabela 2 estão as informações sobre os SNPs avaliados dos genes *IL17RA* e *IL21R*, incluindo a nomenclatura, a descrição e as frequências do alelo raro para as populações: Global, CEU, YRI (disponíveis no banco de dados *1000 genomes*), e para os grupos DM1A e controle.

Observamos que as frequências dos alelos raros na nossa população se aproximaram das da população CEU, em concordância com os dados prévios que evidenciaram que 77% e 71% de pacientes com DM1A e controles, respectivamente tem ancestralidade europeia.[44]

Tabela 2. Frequência das variantes dos genes *IL17RA, IL21R* e Cadeia Gama Comum selecionadas para o estudo.

Gene	Variantes	Alelo Raro	MAF Global	MAF CEU	MAF YRI	MAF DM1A	MAF Controle	Tipo
IL17RA	**rs5748863**	G	44% (A)	41% (G)	26% (A)	45% (G)	46% (G)	Intrônica
22q11.1	**rs2241049**	G	36% (G)	33% (G)	39 % (G)	39% (G)	35% (G)	Intrônica
	rs879577	A (3'-5')	27% (3'-5')	34% (3'-5')	47%(3'-5')	28% (3'-5')	31% (3'-5')	Missense
	rs5992628	T	49% (G)	42 % (T)	44% (T)	45% (T)	44% (T)	3' UTR
IL21R	**rs2214537**	G	34% (C)	34% (C)	47% (C)	39% (G)	40% (G)	Upstream
16p11	**rs7193869**	T	39% (T)	31% (T)	19% (T)	30% (T)	26% (T)	Intrônica
	rs7199138	C	42% (C)	33% (C)	42% (C)	34% (C)	31% (C)	Intrônica
	rs3093315	T	37% (T)	46% (T)	25% (T)	35% (T)	36% (T)	Intrônica
	rs2285452	A	23% (A)	25% (A)	42% (A)	29% (A)	29% (A)	3' UTR
Cadeia Gama Comum	**rs12857595**	A	14% (A)	32% (A)	13% (A)	25% (A)	25% (A)	Intrônica

MAF: Minor Allele Frequency; A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina; Intrônica: Variante de transcrição que ocorre dentro de um íntron; Missense: portadora de uma sequencia que muda um ou mais pares de bases, resultando numa sequencia diferente de aminoácidos, preservando o seu comprimento; Upstream: variante localizada na região 5'; 3´UTR: códon de terminação, região 3' não traduzida; CEU: amostras de indivíduos com ascendência do norte e oeste da Europa; YRI: amostras de indivíduos da Nigéria; *1000 Genome* (banco de dados).

5.2 Resultados Moleculares

5.2.1 Frequências dos genótipos das variantes de *IL17RA*, *IL21R* e *cadeia gama comum.*

Foram selecionadas quatro variantes do gene *IL17RA,* 5 variantes do gene *IL21R* e uma da *Cadeia Gama Comum.* Suas frequências genotípicas estão apresentadas na tabela 3. Duas variantes não obedeceram ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A rs7193869 (*IL21R)*, no grupo controle, foi excluída das análises de susceptibilidade. Entretanto, por obedecer ao EHW no grupo DM1A, foi associada aos anticorpos pancreáticos e extrapancreáticos. A variante da cadeia gama comum (rs12857595), que não obedeceu ao EHW em nenhum dos grupos, foi excluída de todas as analises.

Tabela 3. Frequências genotípicas, frequência do alelo raro e resultados do Equilíbrio de Hardy-Weinberg das variantes de *IL17RA*, *IL21R* e *Cadeia Gama Comum* nos grupos DM1A e controle.

Variante (gene)	Genótipo	DM1A					Controle				
		N	%	MAF	EHW		N	%	MAF	EHW	
					^{2}	p				^{2}	p
rs5748863 (*IL17RA*)	AA	192	30,8				175	27,3			
	AG	306	49,1	0,446	0,02	0,88	338	52,8	0,462	2,48	0,12
	GG	125	20,1				127	19,8			
rs2241049 (*IL17RA*)	AA	220	36,7				278	43,8			
	AG	285	47,6	0,394	0,01	0,92	272	42,8	0,348	1,99	0,16
	GG	94	15,7				85	13,4			
rs879577 (*IL17RA*)	GG	311	50,7				295	47,8			
	AG	260	42,4	0,28	1,57	0,21	250	40,5	0,31	2,84	0,09
	AA	42	6,9				72	11,7			
rs5992628 (*IL17RA*)	GG	192	31,4				190	30,2			
	TG	286	46,7	0,453	1,98	0,16	329	52,3	0,436	2,52	0,11
	TT	134	21,9				110	17,5			
rs2214537 (*IL21R*)	CC	220	37,3				218	35,1			
	CG	280	47,5	0,39	0,003	0,95	304	49	0,404	0,17	0,68
	GG	90	15,3				99	15,9			
rs7193869 (*IL21R*)	CC	305	49,4				336	52,6			
	TC	260	42,1	0,295	0,11	0,74	270	42,3	0,262	5,2	0,02*
	TT	52	8,4				33	5,2			
rs7199138 (*IL21R*)	GG	266	43,5				308	48,7			
	GC	281	46	0,335	0,65	0,42	262	41,4	0,306	0,44	0,51
	CC	64	10,5				63	10			
rs3093315 (*IL21R*)	GG	266	42,7				255	39,6			
	TG	276	44,3	0,352	0,5	0,48	312	48,4	0,362	1,55	0,21
	TT	81	13				77	12			
rs2285452 (*IL21R*)	GG	313	51,1				324	51,3			
	AG	251	40,9	0,285	0,02	0,8	256	40,5	0,285	0,02	0,89
	AA	49	8				52	8,2			
rs12857595 (*cadeia gama comum*)	GG	386	64,8				418	67,3			
	AG	125	21	0,247	113,8	<0,001*	90	14,5	0,254	237,2	<0,001*
	AA	85	14,3				113	18,2			

N: número de indivíduos; MAF: *Minor allele frequency* (frequência do alelo polimórfico); EHW: Equilíbrio de Hardy Weinberg.

5.3 Susceptibilidade ao DM1A conferida pelos genes *IL17RA* e *IL21R*

As variantes foram associadas ao DM1A no modelo de genótipos e nos modelos dominante e recessivo, e, em seguida, ajustadas para as covariáveis: sexo, idade e cor autorreferida.

As variantes rs2241049 e rs879577 do gene *IL17RA* foram associados ao DM1A no modelo de genótipos ($p<0,05$). Indivíduos portadores do genótipo heterozigoto para o polimorfismo rs2241049 (AG) apresentaram risco 1,324 vezes maior de desenvolver DM1A em relação aos portadores do homozigoto mais frequente (AA) e, mesmo após análise de regressão logística, este dado se manteve. E para rs879577, o genótipo homozigoto para o alelo raro (AA) conferiu proteção para a doença, em relação ao homozigoto para o alelo de maior frequência (GG), o que também foi confirmado após ajuste das covariáveis.

No teste do modelo dominante, o alelo raro G de rs2241049 foi associado à susceptibilidade ao DM1A, com risco 1,342 vezes maior de desenvolver DM1A em relação aos portadores do homozigoto mais frequente (AA). E esse dado se manteve após análise de regressão logística (OR_{aj}=1,42; IC 95%$_{aj}$=1,11 - 1,81; p_{aj}=0,005*).

E para a variante rs879577, no teste do modelo recessivo, o genótipo AA (raro) conferiu proteção para DM1A (OR=0,56) em relação aos portadores do alelo mais frequente G, mesmo após ajuste das covariáveis (OR_{aj}=0,61; IC 95%$_{aj}$=0,4 - 0,93; p_{aj}=0,021*).

Apenas uma variante do gene *IL21R* foi associada ao risco do DM1A, a rs7199138, com o alelo C no modelo de genótipos, sendo esse dado confirmado no modelo dominante, após analise de regressão logística (OR_{aj}=1,33; IC 95%$_{aj}$=1,05 - 1,68; p_{aj}=0,018*).

Tabela 4. Associação das variantes do gene *IL17RA* com a susceptibilidade para o DM1A.

Variante	Genótipo	Controle N (%)	DM1A N (%)	OR	IC 95%	p	OR $_{aj}$	IC 95% $_{aj}$	p $_{aj}$
	AA	175 (27)	192 (31)	1	Referência				
rs5748863	AG	338 (53)	306 (49)	0,825	(0,638 - 1,067)	0,339	0,89	(0,68 - 1,17)	0,409
	GG	127 (20)	125 (20)	0,897	(0,651 - 1,236)		1,05	(0,74 - 1,47)	0,798
	AG+GG[1]	465 (72,7)	431 (69,2)	0,845	(0,662 - 1,077)	0,174	0,93	(0,72 - 1,2)	0,59
	GG[2]	127 (19,8)	125 (20,1)	1,014	(0,769 - 1,336)	0,922	1,12	(0,84 - 1,51)	0,433
	AA	278 (44)	220 (37)	1	Referência				
rs2241049	AG	272 (43)	285 (48)	1,324	(1,039 - 1,688)	0,039*	1,41	(1,09 - 1,82)	0,009*
	GG	85 (13)	94 (16)	1,397	(0,992 - 1,968)		1,46	(1,01 - 2,1)	0,043*
	AG+GG[1]	357 (56,2)	379 (63,3)	1,342	(1,068 - 1,686)	0,012*	1,42	(1,11 - 1,81)	0,005*
	GG[2]	85 (13,4)	94 (15,7)	1,204	(0,877 - 1,654)	0,25	1,22	(0,87 - 1,7)	0,259
	GG	295 (48)	311 (51)	1	Referência				
rs879577	AG	250 (41)	260 (42)	0,986	(0,779 - 1,249)	0,014*	1,05	(0,82 - 1,34)	0,712
	AA	72 (12)	42 (6,9)	0,553	(0,366 - 0,836)		0,63	(0,41 - 0,96)	0,033*
	AG+AA[1]	322 (52,2)	302 (49,3)	0,89	(0,711 - 1,113)	0,305	0,96	(0,76 - 1,21)	0,703
	AA[2]	72 (11,7)	42 (6,9)	0,557	(0,374 - 0,829)	0,004	0,61	(0,4 - 0,93)	0,021*
	GG	190 (30)	192 (31)	1	Referência				
rs5992628	TG	329 (52)	286 (47)	0,86	(0,666 - 1,111)	0,076	0,83	(0,63 - 1,08)	0,167
	TT	110 (18)	134 (22)	1,205	(0,873 - 1,664)		1,12	(0,8 - 1,58)	0,503
	TG+TT[1]	439 (69,8)	420 (68,6)	0,947	(0,744 - 1,205)	0,656	0,9	(0,7 - 1,16)	0,426
	TT[2]	110 (17,5)	134 (21,9)	1,323	(0,999 - 1,752)	0,051	1,26	(0,94 - 1,7)	0,12

DMA1A: Indivíduos com diabete melito tipo 1 autoimune; **N:** Número de indivíduos; **OR**: *Odds Ratio*; **IC 95%:** Intervalo de Confiança de 95% sem ajustes para covariáveis; **OR $_{aj}$**: *Odds Ratio* com ajustes para as covariáveis; **IC 95% $_{aj}$**: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis; ***p $_{aj}$** com ajuste para as covaráveis. [1] modelo dominante; [2] modelo recessivo.

Tabela 5. Associação das variantes do gene *IL21R* com a susceptibilidade para o DM1A.

Variante	Genótipo	Controle N (%)	DM1A N (%)	OR	IC 95%	p	OR $_{aj}$	IC 95% $_{aj}$	p $_{aj}$
	CC	218 (35)	220 (37)	1	Referência				
rs2214537	CG	304 (49)	280 (48)	0,913	(0,712 - 1,169)	0,729	0,94	(0,72 - 1,22)	0,626
	GG	99 (16)	90 (15)	0,901	(0,64 - 1,267)		0,98	(0,68 - 1,41)	0,906
	CG+GG[1]	403 (64,9)	370 (62,7)	0,91	(0,72 - 1,15)	0,429	0,95	(0,74 - 1,21)	0,665
	GG[2]	99 (15,9)	90 (15,3)	0,949	(0,696 - 1,295)	0,742	1,02	(0,73 - 1,41)	0,928
	GG	308 (49)	266 (44)	1	Referência				
rs7199138	GC	262 (41)	281 (46)	1,242	(0,982 - 1,571)	0,187	1,35	(1,05 - 1,73)	0,018*
	CC	63 (10)	64 (11)	1,176	(0,801 - 1,728)		1,25	(0,83 - 1,87)	0,283
	GC+CC[1]	325 (51,3)	345 (56,5)	1,229	(0,983 - 1,537)	0,07	1,33	(1,05 - 1,68)	0,018*
	CC[2]	63 (10)	64 (10,5)	1,059	(0,733 - 1,528)	0,761	1,08	(0,73 - 1,59)	0,693
	GG	255 (40)	266 (43)	1	Referência				
rs3093315	TG	312 (48)	276 (44)	0,848	(0,67 - 1,074)	0,335	0,81	(0,64 - 1,04)	0,103
	TT	77 (12)	81 (13)	1,008	(0,706 - 1,44)		0,97	(0,67 - 1,41)	0,97
	TG+TT[1]	389 (60,4)	357 (57,3)	0,88	(0,703 - 1,101)	0,262	0,84	(0,67 - 1,07)	0,158
	TT[2]	77 (12)	81 (13)	1,1	(0,788 - 1,536)	0,574	1,08	(0,76 - 1,54)	0,662
	GG	324 (51)	313 (51)	1	Referência				
rs2285452	AG	256 (41)	251 (41)	1,015	(0,804 - 1,282)	0,981	1,02	(0,8 - 1,31)	0,779
	AA	52 (8,2)	49 (8)	0,975	(0,641 - 1,485)		1,02	(0,66 - 1,6)	0,979
	AG+AA[1]	308 (48,7)	300 (48,9)	1,008	(0,807 - 1,259)	0,942	1,02	(0,81 - 1,29)	0,851
	AA[2]	52 (8,2)	49 (8)	0,969	(0,645 - 1,456)	0,88	1,01	(0,66 - 1,56)	0,958

N: Número de indivíduos; **OR**: *Odds Ratio*; **IC 95%:** Intervalo de Confiança de 95%; **OR $_{aj}$**: *Odds Ratio* com ajustes para as covariáveis; **IC 95% $_{aj}$**: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis; ***p $_{aj}$** com ajuste para as covaráveis. [1] Modelo dominante; [2] Modelo recessivo.

5.4 Gene do receptor da IL17A e presença de autoanticorpos.

5.4.1 Autoanticorpos pancreáticos

Na avaliação do modelo de genótipos entre as variantes e os autoanticorpos pancreáticos, rs5748863 apresentou associação estatisticamente significativa com o anticorpo anti-IA2 entre os pacientes portadores de DM1A (p=0,013), conferindo menor frequência (GG *vs* AA). Após ajuste para as variáveis de confusão, os dados se mantiveram (p=0,047).

Tabela 6. Associação dos polimorfismos de *IL17RA* com os anticorpos pancreáticos na amostra total de pacientes com DM1A.

Variante	Genótipos	Anti-GAD65 N (%)	p	Anti-Znt8 N (%)	p	Anti-IA2 N(%)	p	OR $_{aj}$	IC (95%)	p $_{aj}$
	AA	79 (53,0)		41 (42,2)		62 (44,3)				
rs5748863	AG	123 (46,8)	0,168	86 (53,4)	0,165	116 (47,0)	0,013*			
	GG	45 (41,3)		35 (44,3)		32 (30,2)		0,56	(0,32 - 0,99)	0,047*
	AA	97 (52,4)		56 (47,0)		77 (43,0)				
rs2241049	AG	109 (46,3)	0,212	72 (48,3)	0,978	93 (42,0)	0,919			
	GG	34 (41,4)		26 (48,1)		31 (40,2)				
	GG	122 (47,8)		80 (49,3)		113 (47,1)				
rs879577	AG	107 (47,8)	0,976	70 (47,2)	0,934	80 (37,2)	0,053			
	AA	17 (45,9)		11 (47,8)		11 (32,2)				
	GG	73 (47,0)		49 (45,3)		60 (40,2)	0,2			
rs5992628	TG	113 (47,0)	0,581	69 (47,5)	0,619	91 (40,4)				
	TT	61 (52,5)		41 (52,5)		55 (50,0)				

N: Número de indivíduos; **OR $_{aj}$**: *Odds Ratio* com ajustes para as covariáveis; **IC 95% $_{aj}$**: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis; ***p $_{aj}$** com ajuste para as covariáveis; a**nti-GAD65: a**nticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico 65; a**nti-Znt8:** anticorpo antitransportador do zinco 8; a**nti-IA2: a**nticorpo antitirosina fosfatase.

Como no modelo de genótipos a variante rs5748863 estava associada à menor frequência de Anti-IA2, avaliamos os modelos dominante e recessivo. Na tabela 6, observamos que no modelo recessivo persistiram os resultados para o genótipo GG, mesmo após análise de regressão logística p_{aj}=0,010 (Tabela 7)

Tabela 7. Associação entre o polimorfismo rs5748863 e o anticorpo antitirosina-fosfatase (anti-IA2) na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo recessivo.

rs5748863 ***(IL17RA)***	**Anti-IA2**	**Genótipos**		**P**	**OR $_{aj}$**	**95% IC $_{aj}$**	**p $_{aj}$**
		AA/AG N (%)	**GG N (%)**				
Modelo Recessivo	Positivo	178 (46,0)	32 (30,2)	0,004*	0,52	(0,32 - 0,86)	0,010*
	Negativo	209 (54,0)	74 (69,8)				

N: Número de indivíduos; **OR $_{aj}$**: *Odds Ratio* com ajustes para as covariáveis; **IC 95% $_{aj}$**: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis; ***p $_{aj}$** com ajuste para duração da doença, sexo e cor autorreferida;

No modelo de genótipos também foi sugerida a associação da variante rs879577 com a menor frequência de anti-IA2 (p=0,053); sendo então testada para os modelos dominante e recessivo. No modelo dominante, os resultados se confirmaram após ajuste das covariáveis (OR_{aj}=0,67; IC $95\%_{aj}$=0,45 - 0,99; p_{aj}=0,043*), indicando menor susceptibilidade à formação de anti-IA2. (tabela 8).

Tabela 8. Associação entre o polimorfismo rs879577 e o anticorpo anti-IA2 na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo dominante.

rs879577 ***(IL17RA)***	**Anti-IA2**	**Genótipos**		**p**	**OR $_{aj}$**	**95% IC $_{aj}$**	**p $_{aj}$**
		GG N (%)	**AG/AA N (%)**				
Modelo Dominante	Positivo	113 (47,0)	91 (36,6)	0,018*	0,67	(0,45 - 0,99)	0,043*
	Negativo	127 (53,0)	158 (63,4)				

N: Número de indivíduos; **OR $_{aj}$**: *Odds Ratio* com ajustes para as covariáveis duração da doença, sexo e cor autorreferida; **IC 95% $_{aj}$**: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis; ***p $_{aj}$** com ajuste para as covaráveis;

5.4.2 Autoanticorpos extrapancreáticos

Dentre as variantes do gene do receptor da IL17RA, apenas o genótipo TG de rs5992628, foi associado à maior frequência do anticorpo antitireoglobulina em relação à GG, mesmo após análise de regressão logística (OR_{aj}=1,93; IC 95% $_{aj}$=1,1-3,42; p $_{aj}$=0,023) (Tabela 9) . A frequência do anticorpo antitireoglobulina nos portadores dos genótipos TG+TT (28,5%) não diferiu significativamente daqueles com genótipo GG (19,7%)(p=0,073).

Tabela 9. Associação dos anticorpos extrapancreáticos com as variantes do gene do receptor da interleucina *IL17A* em pacientes com DM1A.

Variante	Genótipos	Anti-célula Parietal N (%)	P	FAN N (%)	p	Anti-endomisio N (%)	p	Anti-TPO N (%)	p	TRAb N (%)	P	Anti-tireoglobulina N (%)	p	OR $_{aj}$	IC (95%)	p $_{aj}$
	AA	7 (8,7)		16 (29,6)		3 (3,1)		33 (28,4)		5 (6,8)		29 (25,4)				
rs5748863	AG	13 (9,8)	0,651	24 (20,0)	0,133	6 (4,1)	0,926	63 (32,1)	0,492	6 (4,8)	0,692	55 (28,0)	0,652			
	GG	3 (5,2)		8 (14,3)		3 (4,8)		21 (25,3)		4 (7,8)		19 (22,9)				
	AA	9 (9,2)		20 (24,0)		3 (2,8)		47 (34,3)		4 (4,5)		37 (27,4)				
rs2241049	AG	11 (8,7)	0,547	22 (20,8)	0,802	5 (3,6)	0,305	48 (26,5)	0,211	7 (6,0)	0,648	47 (26,1)	0,466			
	GG	1 (2,9)		7 (19,4)		4 (8,1)		15 (24,2)		3 (8,8)		12 (19,3)				
	GG	10 (7,3)		29 (25,4)		8 (4,9)		57 (28,0)		3 (2,4)		54 (26,3)				
rs879577	AG	10 (8,8)	0,553	19 (19,0)	0,152	4 (3,4)	0,833	48 (30,2)	0,889	9 (8,7)	0,083	42 (26,8)	0,786			
	AA	3 (14,3)		1 (5,8)		1 (4,2)		9 (30,0)		1 (5,9)		6 (20,7)				
	GG	7 (8,8)		15 (2,3)		1 (1,1)		28 (25,7)		2 (2,7)		22 (19,6)				
rs5992628	TG	11 (8,5)	1	23 (19,7)	0,828	9 (6,3)	0,179	61 (31,6)	0,43	8 (6,6)	0,185	60 (31,4)	0,048*	1,93	(1,1 - 3,42)	0,023*
	TT	4 (7,2)		11 (22,0)		3 (4,8)		22 (25,6)		5 (10,9)		18 (21,7)				

N: Número de indivíduos; **OR**: *Odds Ratio*; **IC 95%:** Intervalo de Confiança de 95% sem ajustes para covariáveis; **OR $_{aj}$**: *Odds Ratio* com ajustes para as covariáveis; **IC 95% $_{aj}$**: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis; ***p $_{aj}$** com ajuste para as covaráveis; **FAN:** Fator antinuclear ; **Anti-TPO:** Anticorpo antitireoperoxidase**; TRAb:** Anticorpo antirreceptor do hormônio estimulador da tireoide**.**

5.5 Gene do receptor da IL21 e autoanticorpos

5.5.1 Autoanticorpos pancreáticos

As variantes do gene *IL21R* não foram associados à expressão dos autoanticorpos pancreáticos anti-GAD65, anti-IA2 e anti-Znt8 (Tabela 10).

Tabela 10. Associação das variantes de *IL21R* com os anticorpos pancreáticos na amostra total de pacientes com DM1A.

Variante	Genótipos	Anti-GAD65 N (%)	p	Anti-ZnT8 N(%)	p	Anti-IA2 N (%)	p
rs2214537 *(IL21R)*	CC	84 (45,7)	0,442	55 (44,7)	0,271	77 (44,8)	0,806
	CG	120 (51,0)		71 (47,3)		93 (41,5)	
	GG	33 (44,6)		28 (58,3)		31 (43,7)	
rs7193869 *(IL21R)*	CC	122 (47,2)	0,827	82 (46,3)	0,538	103 (41,4)	0,098
	TC	104 (48,3)		65 (48,5)		81 (41,0)	
	TT	23 (52,3)		14 (58,3)		24 (58,5)	
rs7199138 *(IL21R)*	GG	107 (48,0)	0,456	67 (43,5)	0,071	83 (39,3)	0,332
	GC	107 (45,3)		81 (55,1)		98 (43,9)	
	CC	29 (54,7)		12 (38,7)		25 (50,0)	
rs3093315 *(IL21R)*	GG	111 (50,7)	0,531	64 (42,7)	0,205	81 (39,5)	0,093
	TG	105 (45,7)		70 (52,6)		91 (41,9)	
	TT	33 (45,8)		28 (51,9)		38 (54,3)	
rs2285452 *(IL21R)*	GG	120 (44,9)	0,11	81 (47,1)	0,91	104 (40,9)	0,841
	AG	101 (48,8)		64 (49,6)		83 (43,2)	
	AA	25 (62,5)		15 (48,4)		17 (44,7)	

N: Número de indivíduos; **Anti-GAD65:** anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico 65; **Anti-Znt8:** anticorpo antitransportador do zinco 8; **Anti-IA2:** anticorpo antitirosina fosfatase.

5.5.2 Autoanticorpos extrapancreáticos

No modelo de genótipos a variante rs2214537, foi associada à menor frequência do anticorpo anticélula parietal, mesmo após ajuste das covariáveis (p_{aj}=0,003). A rs2285452 foi associada à menor frequência do anticorpo anti-endomisio, que se manteve após regressão logística (p_{aj}=0,045), e maior frequência do antitireoglobulina (p=0,01) que não se manteve após ajuste. E para rs3093315, houve tendência à associação com TRAb (p=0,053), sendo também avaliada nos próximos modelos (Tabela 11).

Tabela 11. Associação dos anticorpos extrapancreáticos com as variantes do gene *IL21R* em pacientes com DM1A.

Variante	Genótipos	Anticélula Parietal N (%)	P	p_{aj}	FAN N (%)	p	Anti-endomisio N (%)	p	p_{aj}	Anti-TPO N (%)	p	p_{aj}	Anti-tireoglobulina N (%)	p	TRAb N (%)	p
rs2214537 ***(IL21R)***	CC	15 (16,9)	0,005*	0,003*	21 (26,9)	0,34	6 (5,5)	0,628		38 (27,1)	0,675		34 (24,5)	0,808	6 (7,0)	0,461
	CG	5 (4,1)			19 (18,2)		4 (3,1)			54 (31,5)			46 (27,2)		5 (4,6)	
	GG	3 (7,3)			8 (19,0)		2 (4,1)			18 (28,1)			18 (28,1)		4 (9,5)	
rs7193869 ***(IL21R)***	CC	9 (6,4)	0,306		24 (18,9)	0,295	6 (4,0)	0,289		54 (27,4)	0,307		52 (26,5)	0,535	9 (7,0)	0,342
	TC	12 (11,9)			19 (21,8)		4 (3,3)			51 (32,9)			43 (28,0)		4 (4,1)	
	TT	1 (4,2)			6 (35,3)		3 (9,3)			8 (21,6)			7 (19,0)		2 (10,0)	
rs7199138 ***(IL21R)***	GG	9 (7,5)	0,232		17 (15,9)	0,167	6 (4,5)	0,703		54 (31,2)	0,151		44 (25,1)	0,782	7 (6,2)	0,562
	GC	9 (7,8)			25 (25,5)		7 (5,1)			41 (23,6)			43 (25,4)		5 (4,9)	
	CC	5 (17,2)			7 (28,0)		0 (0,0)			15 (35,7)			13 (30,2)		3 (1,0)	
rs3093315 ***(IL21R)***	GG	10 (9,3)	0,954		19 (19,6)	0,275	4 (3,2)	0,499		45 (26,0)	0,315		40 (23,4)	0,463	2 (1,9)	0,053
	TG	10 (8,5)			26 (25,5)		8 (5,9)			51 (30,4)			49 (29,3)		9 (8,8)	
	TT	3 (6,8)			4 (12,5)		1 (2,3)			19 (36,5)			14 (26,4)		4 (10,3)	
rs2285452 ***(IL21R)***	GG	11 (8,0)	0,137		23 (19,0)	0,526	11 (7,3)	0,049*	0,045*	60 (30,9)	0,01*	0,087	45 (23,2)	0,466	6 (4,9)	0,671
	AG	7 (6,9)			19 (21,8)		2 (1,6)			37 (22,7)			46 (28,4)		8 (8,0)	
	AA	5 (19,2)			7 (29,1)		0 (0,0)			15 (48,4)			9 (30,0)		1 (4,5)	

N: Número de indivíduos; **OR**: Odds Ratio; **IC 95%:** Intervalo de Confiança de 95% sem ajustes para covariáveis; **OR** $_{aj}$: Odds Ratio com ajustes para as covariáveis; **IC 95%** $_{aj}$: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis; ***p** $_{aj}$ com ajuste para as covaráveis; **FAN:** fator antinuclear ; **Anti-TPO:** Anticorpo antitireoperoxidase**; TRAb:** Anticorpo antirreceptor do hormônio estimulador da tireoide**.**

Na tabela 12, confirmamos que a variante rs2214537, com o alelo raro G (modelo dominante), foi associada à menor frequência do anticorpo anticelula parietal, e este dado se manteve após analise de regressão (p<0,001) (Tabela 12).

Tabela 12. Associação entre a variante rs2214537 e a frequência do anticorpo anticélula parietal na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo dominante.

rs2214537	Anti-célula parietal	Genótipos CC N (%)	CG/GG[1] N (%)	p	OR_{aj}	IC (95%) $_{aj}$	p_{aj}
Modelo Dominante	Positivo	15 (16,9)	8 (4,9)	0,002*	0,24	(0,09 - 059)	<0,001*
	Negativo	74 (83,1)	156 (95,1)				

N: Número de indivíduos; OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; **OR** $_{aj}$: Odds Ratio com ajustes para as covariáveis duração da doença, sexo e cor auto referida; **IC 95%** $_{aj}$: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis duração da doença, sexo e cor auto referida; ***p** $_{aj}$ com ajuste para as covaráveis duração da doença, sexo e cor autorreferida.

A rs3093315, no modelo dominante (alelo raro T), conferiu maior frequência do auto anticorpo TRAb. Este resultado se confirmou, após ajustes das covariáveis (OR_{aj}=5,90; IC 95% $_{aj}$=1,26-27,61; p $_{aj}$=0,024) (Tabela 13).

Tabela 13: Associação entre a variante rs3093315 e a frequência do anticorpo TRAb na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo dominante.

rs3093315	TRAb	Genótipos GG N (%)	TG/TT[1] N (%)	p	OR_{aj}	IC (95%) $_{aj}$	p_{aj}
Modelo Dominante	Positivo	2 (1,9)	13 (9,2)	0,016*	5,89	(1,26 - 27,61)	0,024*
	Negativo	105 (98,1)	128 (90,8)				

N: Número de indivíduos; OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; **OR** $_{aj}$: Odds Ratio com ajustes para as covariáveis duração da doença, sexo e cor autorreferida; **IC 95%** $_{aj}$: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis duração da doença, sexo e cor auto referida; ***p** $_{aj}$ com ajuste para as covaráveis duração da doença, sexo e cor auto referida.

A variante rs2285452 foi associada à menor frequência do auto anticorpo anti-endomisio, no modelo dominante (alelo raro A),(OR_{aj}=0,17; IC 95% $_{aj}$=0,04 - 0,8; p $_{aj}$=0,025) (Tabela 14), e no modelo recessivo, à maior frequência do anticorpo anti-TPO (OR_{aj}=2,38; IC 95% $_{aj}$=1,1-5,13; p $_{aj}$=0,028) (Tabela 15).

Tabela 14: Associação entre o rs2285452 e a frequência do anticorpo **anti-endomísio** na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo dominante.

rs2285452	Anti-endomisio	Genótipos GG N (%)	Genótipos AG/AA N (%)	p	OR $_{aj}$	IC (95%) $_{aj}$	p $_{aj}$
Modelo Dominante	Positivo	11 (7,3)	2 (1,3)	0,02*	0,17	(0,04 - 0,8)	0,025*
	Negativo	139 (92,7)	147 (98,7)				

N: Número de indivíduos; OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; **OR $_{aj}$**: Odds Ratio com ajustes para as covariáveis duração da doença, sexo e cor auto referida; **IC 95% $_{aj}$**: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis duração da doença, sexo e cor auto referida; ***p $_{aj}$** com ajuste para as covaráveis duração da doença, sexo e cor auto referida.

Tabela 15: Associação entre o polimorfismo rs2285452 e o anticorpo **anti-TPO** na amostra total de pacientes com DM1A, no modelo recessivo.

rs2285452	Anti-TPO	Genótipos GG/AG N (%)	Genótipos AA N (%)	p	OR $_{aj}$	IC (95%) $_{aj}$	p $_{aj}$
Modelo Recessivo	Positivo	97 (27,2)	15 (48,4)	0,012*	2,38	(1,1 - 5,13)	0,028*
	Negativo	260 (78,8)	16 (51,6)				

N: Número de indivíduos; OR: Odds Ratio; 95% IC: Intervalo de Confiança de 95%; **OR $_{aj}$**: Odds Ratio com ajustes para as covariáveis duração da doença, sexo e cor auto referida; **IC 95% $_{aj}$**: Intervalo de Confiança de 95% com ajustes para as covariáveis duração da doença, sexo e cor auto referida; ***p $_{aj}$** com ajuste para as covaráveis duração da doença, sexo e cor autorreferida.

6 DISCUSSÃO

O DM1A é uma doença autoimune crônica que resulta na destruição das células beta do pâncreas. Envolve fatores genéticos, ambientais e imunológicos.[1,45]

Os estudos dos fatores genéticos de susceptibilidade ao DM1A são importantes para a identificação de indivíduos que apresentam risco para DM1A, que poderão ser submetidos a terapias preventivas futuras. Marcadores genéticos podem ainda elucidar mecanismos fisiopatológicos, como os que acarretam maior positividade dos anticorpos pancreáticos e extrapancreáticos, associados ao diabetes e a outras doenças autoimunes.

O processo destrutivo das células beta pancreáticas, produtoras de insulina, já está bem elucidado com relação à participação dos linfócitos T CD4+ e CD8+ autorreativos, mas os mecanismos moleculares e as vias de ativação das citocinas que contribuem no controle deste processo ainda não são claros. [46]

A via Th17, produzindo várias citocinas como a IL-17 e IL-21, participa ativamente nos processo inflamatórios e autoimunes, inclusive do diabetes, em modelos animais e humanos.[27]

A IL17A e seu receptor possuem características estruturais únicas que medeiam eventos de sinalização diferentes daqueles desencadeados por outras citocinas envolvidas normalmente na imunidade adaptativa. Assim, a via Th17 parece atuar como uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa .[47]

O seu receptor tem expressão ubíqua, presente na membrana de fibroblastos, células epiteliais e do sistema imunológico, como os linfócitos T e B. A regulação do *IL17R* é importante no controle da inflamação mediada por IL17 e desempenha papel significativo nas suas funções[48] sendo, inclusive, um candidato terapêutico cujo bloqueio venha prevenir as alterações mediadas pela IL17.[31]

Variantes do *IL17RA* foram previamente associadas a alterações inflamatórias e autoimunes, presentes na doença de Chron, doença celíaca, alopecia e psoríase, sugerindo sua participação na inflamação e autoimunidade.[49–51]

Já a IL-21 é uma citocina pleiotrópica, produzida por células T e *natural killer* T (NKT). Contribui para o desenvolvimento de doenças autoimunes através da diferenciação da via Th17, produção de autoanticorpos e inibição da geração de células T reguladoras.[52] Liga-se ao seu receptor, um complexo heterodimérico formado pela cadeia IL-21R e a cadeia gama comum, encontrado em linfócitos T CD4+, CD8+ e B[53], macrófagos e células dendríticas [30]. Polimorfismos dos genes *IL21* e *IL21R* foram associados ao lupus eritematoso sistêmico [54,55], à doença autoimune tiroidiana e à doença de Kawasaki[56]

No entanto, os dados de literatura ainda são escasso quanto à relevância da via Th17 na fisiopatologia do diabetes autoimune. Em estudos prévios não verificamos a ativação ou alterações das interleucinas desta via nos portadores de DM1A. A expressão dos receptores da IL21 e da IL17 em linfócitos T CD3+ e CD4+ periféricos em pacientes com diabetes de inicio recente estava diminuída em relação a controles normais [46,57].Também não observamos polimorfismos nos genes da IL17 [7], IL21[8] e IL27[36] que pudessem influir na expressão da via Th17. Em contrapartida, variantes da IL23A (rs11171806 e rs2066808- haplótipo GG) conferiram proteção ao DM1A [37].

Dessa forma, buscamos alterações genéticas nos genes de *IL-21R* e *IL-17RA* que pudessem favorecer o desenvolvimento de DM1A e a autoimunidade.

Com este intuito, avaliamos quatro variantes do gene *IL17RA* e cinco do gene *IL21R* quanto à susceptibilidade ao DM1A e à presença dos anticorpos pancreáticos e extrapancreáticos. Estas associações foram feitas considerando os modelos de genótipos, o dominante e o recessivo. Também foram estimados modelos de regressão logística devidamente ajustados para as covariáveis de confusão. Para as análises multivariadas de susceptibilidade incluímos sexo, cor autorreferida e idade e, nas de positividade dos anticorpos, sexo, cor autorreferida e duração da doença, após demonstração de associação nas análises univariadas. Nas multivariadas, o genótipo homozigoto mais frequente foi considerado como o de referência.

Dentre as variantes selecionadas do gene *IL17RA,* duas foram relacionadas à susceptibilidade do DM1A. Considerando a rs2241049, intrônica, os indivíduos portadores do alelo G tiveram risco 1,42 vezes maior de desenvolver DM1A em

relação aos controles normais. Testes de predição das ligações de fatores de transcrição demonstraram perda de alguns fatores que parecem atuar na homeostasia do sistema imunológico. Entre eles o FOXP3 (*forkhead box P3*), que atua como um regulador mestre no desenvolvimento de células T reguladoras, que refreiam a autoimunidade. Perdeu-se também o sítio para C/EBPbeta (*Enhancer Binding Protein)*, que é importante na regulação de genes inflamatórios, incluindo os de citocinas.. Esta proteína parece ser importante também na sinalização intracelular da IL-17, já que o domínio citoplasmático da IL-17RA medeia sinais supressores da ação da IL-17 através da fosforilação de C/EBPbeta.[47]. O mesmo ocorreu com o sítio para NF-Y (*Nuclear Factor of Y Box)*: complexo que distorce e compacta a estrutura do DNA, provendo locais adicionais de ligação de fatores de transcrição, podendo influir na expressão gênica.

Alterações funcionais desta variante ainda não estão definidas. Este polimorfismo não conferiu susceptibilidade à doença de Chron, mas foi relacionado a maiores graus de disfunção do enxerto primário em transplante de pulmão (PGD=*Primary Graft Dysfunction*), e à neutrofilia, segundo Somers et cols, com forte impacto inflamatório.[58]

Em contrapartida, o variante missense rs879577 (genótipo AA) da *IL17RA* conferiu proteção ao DM1A (OR_{aj}=0,61; IC $95\%_{aj}$=0,4 - 0,93; p_{aj}=0,021*), e também foi relacionada à menor frequência do autoanticorpo anti-IA2 (com apenas uma cópia do alelo A). Análises realizadas através dos *sites* de predição *Polyphen: Prediction of functional effect of human nsSNPs* e *SIFT* (ensembl), indicam que as mudanças são toleráveis (SIFT: 0.49 - tolerado e Polyphen 0.004 - benigno). Foi incluída no estudo por predispor à Alopécia Areata (50). Esta variante condiciona modificação no sítio de ligação de YY1 (*transcription factor Yin Yang 1*) que atua como repressor e ativador da transcrição gênica e na modificação de histonas

Outra variante de *IL-17RA*, a rs5748863 (GG),intrônica, também conferiu menor frequência do anticorpo anti-IA2, mas não repercutiu em mudanças com relação aos sítios de ligação de fatores de transcrição.

Nossos dados são sugestivos do envolvimento de *IL-17RA* no diabetes autoimune. A tendência à maior frequência do anticorpo anti-tireoglobulina,

condicionada à rs5992628 (p=0,073) também corrobora sua importância na autoimunidade

Sabe-se que as células Th17 exibem grande plasticidade. Tanto as células Th17 quanto as T reguladoras (Tregs) dependem do estímulo de TGF beta. E as células Th17 podem se converter em reguladoras e vice versa, ou também em células Th1. Esta plasticidade tem sido atribuída a modificações epigenéticas dos genes que codificam fatores de transcrição que direcionam as diferentes linhagens das vias T auxiliares. Em consequência, nem todas as células Th17 são patogênicas e a sua patogenicidade parece ser influenciada pelo ambiente. Esta flexibilidade frente a diferentes desafios imunológicos poderia também depender de variantes *do IL-17RA*, condicionando a sinalização desta via e exercendo efeitos de proteção ou de risco para doenças autoimunes.

Em relação ao receptor da IL-21, nós verificamos que também o alelo C de rs7199138, intrônico, conferiu susceptibilidade para o DM1A (OR=1,33; p= 0,018). Este polimorfismo acarreta perda do sítio de ligação de c-Ets1 (*ETS proto-oncogene 1, transcription factor*), que controla a expressão de genes de citocinas e quimiocinas em uma ampla variedade de células, controla a diferenciação, sobrevivência e proliferação de células linfoides. Por outro lado ganha o sítio para o FOX-P3, regulador negativo do sistema imunológico. Sugere-se que alterações transcricionais possam levar ao risco de DM1A, talvez associadas a fatores epigenéticos que condicionam plasticidade na expressão dos genes.

Sabe-se que a IL-21 é uma citocina que influi na diferenciação dos linfócitos B e na formação de anticorpos.[45]Corroborando este dado, verificamos a associações de dois polimorfismos de *IL-21R* com a menor frequência dos auto anticorpos anticélula parietal (rs2214537- 4,9% x 16,9%; p<0,001) e anti-endomísio (rs2285452- 1,3% x 7,3%; p=0,025-). Evidenciamos também a influência de *IL-21R* na doença autoimune tiroidiana: maior frequência de TRAB (rs3093315- 9,2% x 1,9%; p= 0,024) e de antitireoperoxidase (rs2285452, 48,4% x 27,2%; p=0,028). Esta última variante foi previamente associada à tireoidite de Hashimoto(59) em indivíduos não diabéticos e ao lupus eritematoso sistêmico[55]. A rs2285452 está em desequilíbrio de ligação com rs3093301, que conferiu intensa resposta à infecção por vírus C, evidenciando seu papel na resposta inflamatória. No entanto, não

alterou sítios de ligação para fatores de transcrição e os mecanismos para a predisposição à autoimunidade ainda não são claros.

A IL-21 é também uma citocina com ações pleiotrópicas e antagônicas- considerada como uma espada de dois gumes. Após a ligação com seu receptor, através da estimulação de STAT1, induz a expressão de INF-gama e Tbet e a produção de anticorpos. Em contrapartida, ao ativar a via STAT3, favorece a proliferação de linfócitos T e B, mas também a produção de IL-10 , que é uma citocina com atividade imunossupressora. A produção de células B reguladoras (células B10) pode ser expandida in vitro pela presença de IL-21. Estas células B reguladoras também degradam o receptor de células T e limitam a proliferação celular. A própria IL-21 ainda é capaz de induzir a apoptose de células B e tem efeito duplo nas células dendríticas derivadas da medula óssea: inibe a maturação e ação destas células e promove a apoptose de células dendríticas, mas promove respostas imunológicas induzindo a produção de IL-1 beta nestas células. Outros efeitos supressores incluem a expansão de células T CD8+ supressoras e a indução de expressão de IL-22 em células T CD4+. Estas ações divergentes, que poderiam repercutir em proteção ou susceptibilidade a diferentes doenças autoimunes, parecem depender fundamentalmente do ambiente de citocinas, mas também poderiam estar associadas às diferentes sinalizações da IL-21, mediadas pelas variantes de IL-21R.

Nossos dados evidenciam sua influência na formação de anticorpos pancreáticos e extrapancreáticos e na predisposição para DM1A, sugerindo papel ativo na autoimunidade.

Tal como outros distúrbios imunológicos, o DM1A é derivado da interação de múltiplas redes, formadas por vários *loci* de susceptibilidade, que exercem efeitos sinérgicos ou aditivos, e cujo impacto sofre influência de agentes ambientais. A presença de desequilíbrio de ligação das variantes de IL-17RA e IL-21R com outras, no mesmo gene ou em outros genes presentes no mesmo cromossomo, também deve ser considerada. Assim, estudos adicionais são necessários para melhor definir as variantes causais, explorando as interações epigenéticas.

7 CONCLUSÕES

- Variantes no gene *IL17RA* foram associadas à proteção ao DM1A (rs879577- alelo A) e à menor frequência do autoanticorpo anti-IA2 (rs879577- alelo A ; e rs5748863- alelo G).

- Susceptibilidade para DM1A e maior frequência de autoanticorpo antitireoglobulina foram conferidas pelas variantes rs2241049 (alelo G) e rs5992628 (alelo T) de *IL-17RA*, respectivamente.

- Variantes do gene *IL21R*, foram relacionadas à susceptibilidade ao DM1A (rs7199138- alelo C) e a maiores frequências dos autoanticorpos TRAb (rs3093315 - alelo T) e anti-TPO (rs2285452 – alelo A).

- O gene *IL-21R* foi também associado à menor frequência dos autoanticorpos anti-endomísio (rs2285452 – alelo A) e anticélula parietal (rs2214537 - alelo G).

- Nossos dados sugerem que variantes nos genes dos receptores das interleucinas IL17A e IL21 estão associadas à autoimunidade e predispõe ao DM1A e auto anticorpos.

8 REFERENCIAS

1. Rossi ME, Silva D, Mory D, Davini E. Marcadores Genéticos e Auto-Imunes do Diabetes Melito Tipo 1: da Teoria para a Prática revisão. Arq Bras Endrocrinol Metab. 2008;52(2).

2. Karlsen AE, Dyrberg T. Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity. Semin Immunol [Internet]. 1998 [cited 2016 Nov 4];10(1):25–34.

3. Alves LI, Davini E, Correia MR, Fukui RT, Santos RF, Cunha MR, et al. Autoantibodies and High-Risk HLA Susceptibility Markers in First-Degree Relatives of Brazilian Patients with Type 1 Diabetes Mellitus: A Progression to Disease Based Study.

4. Gomes MB, Cobas RA, Matheus AS, Tannus LR, Negrato CA, Rodacki M, et al. Regional differences in clinical care among patients with type 1 diabetes in Brazil : Brazilian Type 1 Diabetes Study Group. Diabetes Care. 2012 Feb 1;28(2):1–12.

5. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ, Denver C. Chapter 1: Epidemiology of Type 1 Diabetes.

6. Gomes MB, Tannus LRM, Matheus AS de M, Cobas RA, Palma CCS, Silva ATK, et al. Prevalence, awareness, and treatment of hypertension in patients with type 1 diabetes: a nationwide multicenter study in Brazil. Int J Hypertens [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 6];2013:565263.

7. Fores JP. Impacto da IL-17A na predisposição ao diabetes mellitus tipo 1A [Internet]. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2011 [cited 2017 Apr 6].

8. Crisostomo LG. Expressão dos receptores das interleucinas de cadeia gama comum em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 com início recente [Internet]. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2010 [cited 2017 Apr 6].

9. Pugliese A, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus of man: genetic susceptibility and resistance. Adv Exp Med Biol [Internet]. 2004 [cited 2017 Apr 6];552:170–203.

10. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Davis B, Michels AW. Type 1 diabetes.

11. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, et al. Genetics of type 1 diabetes: what’s next? Diabetes [Internet]. 2010 Jul [cited 2017 Apr 6];59(7):1561–71.

12. Noble JA, Erlich HA. Genetics of Type 1 Diabetes. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2017 Apr 6];2(1):a007732–a007732.

13. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. Curr Diab Rep [Internet]. 2011 Dec [cited 2017 Apr 6];11(6):533–42.

14. Nohra R, Beyeen AD, Guo JP, Khademi M, Sundqvist E, Hedreul MT, et al. RGMA and IL21R show association with experimental inflammation and multiple sclerosis. Genes Immun [Internet]. 2010 Jun 14 [cited 2016 Nov 5];11(4):279–93.

15. Wagner Silva de Souza A, Mesquita Júnior D, Antônio Pereira Araújo J, Tieko Takao Catelan T, de Melo Cruvinel W, Eduardo Coelho Andrade L, et al. Sistema Imunitário – Parte III O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. Rev Bras Reum. 2010;50(6):665–94.

16. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. Annu Rev Immunol [Internet]. 1989 Apr [cited 2016 Nov 5];7(1):145–73.

17. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T H -17 cells requires transforming growth factor-β and induction of the nuclear receptor RORγT.

18. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med JEM [Internet]. 2005 [cited 2016 Nov 4];0(2):233–40.

19. Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, Mcclanahan TK, Fick RB, et al. Monoclonal Anti–Interleukin 23 Reverses Active Colitis in a T Cell–Mediated Model in Mice.

20. Mills KHG. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. Eur J Immunol [Internet]. 2008 Oct [cited 2016 Nov 5];38(10):2636–49.

21. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: The third member of the effector T cell Trilogy.

22. Erwin W. Gelfand M. An Update on Transcription Factors in Asthma [Internet]. Medscape Allergy & Immunology. [cited 2017 Apr 6].

23. Niegowska M, Rapini N, Piccinini S, Mameli G, Caggiu E, Manca Bitti ML, et al. Type 1 Diabetes at-risk children highly recognize Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis epitopes homologous to human Znt8 and Proinsulin. Sci Rep [Internet]. 2016 Feb 29 [cited 2016 Nov 16];6:22266.

24. Mojibian M, Chakir H, Lefebvre DE, Crookshank JA, Sonier B, Keely E, et al. Diabetes-Specific HLA-DR–Restricted Proinflammatory T-Cell Response to Wheat Polypeptides in Tissue Transglutaminase Antibody–Negative Patients With Type 1 Diabetes.

25. Tartar DM, Vanmorlan AM, Wan X, Guloglu FB, Jain R, Haymaker CL, et al. FoxP3 + RORγt + T helper intermediates display suppressive function against autoimmune diabetes 1.

26. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. Nature. 2000;408(2).

27. Arif S, Moore F, Marks K, Bouckenooghe T, Dayan CM, Planas R, et al. Peripheral and Islet Interleukin-17 Pathway Activation Characterizes Human Autoimmune Diabetes and Promotes Cytokine-Mediated b-Cell Death.

28. Osaki M, Takamatsu D, Tsuji N, Sekizaki T. Cloning and Characterization of the Gene Encoding O -Acetylserine Lyase from Streptococcus suis. Curr Microbiol [Internet]. 2000 Jan 31 [cited 2016 Nov 5];40(1):67–71.

29. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily.

30. Spolski R, Leonard WJ. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. Nat Rev Drug Discov [Internet]. 2014 Apr 22 [cited 2016 Nov 5];13(5):379–95.

31. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease.

32. Zeng R, Spolski R, Casas E, Zhu W, Levy DE, Leonard WJ. The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. Blood [Internet]. 2007 May 15 [cited 2017 Apr 6];109(10):4135–42.

33. Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. Immunol Rev [Internet]. 2004 Dec [cited 2016 Nov 5];202(1):84–95.

34. Mitoma H, Horiuchi T, Kimoto Y, Tsukamoto H, Uchino A, Tamimoto Y, et al. Decreased expression of interleukin-21 receptor on peripheral B lymphocytes in systemic lupus erythematosus. Int J Mol Med [Internet]. 2005 Oct [cited 2017 Apr 6];16(4):609–15.

35. Mainardi-Novo DTO, Santos AS, Fukui RT, Gamberini M, Correia MRS, Ruiz MO, et al. The PTPN22 1858T allele but not variants in the proximal promoter region of IL-21 gene is associated with the susceptibility to type 1 diabetes and the presence of autoantibodies in a Brazilian cohort. Investig Médica. 18.

36. Santos AS, Melo ME, Crisóstomo LG, Fukui RT, Matioli SR, Elizabeth Silva MR. Lack of association between IL27 gene variants and type 1 diabetes susceptibility. Cytokine. 2013;61:349–52.

37. Costa VS, Santos AS, Fukui RT, Mattana TCC, Matioli SR, Silva MER. Protective effect of interleukin-23A (IL23A) haplotype variants on type 1A diabetes mellitus in a Brazilian population. Cytokine [Internet]. 2013 May [cited 2016 Nov 5];62(2):327–33.

38. SBD | Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. Métodos e critérios para o diagnóstico [Internet]. GUANABARA KOOGAN. 2016 [cited 2017 Apr 7]. p. 11–2.

39. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res [Internet]. 1988 Feb 11 [cited 2017 Apr 6];16(3):1215.

40. Thorisson GA, Smith A V, Krishnan L, Stein LD. The International HapMap Project Web site.

41. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of

LD and haplotype maps. Bioinformatics [Internet]. 2005 Jan 15 [cited 2016 Nov 5];21(2):263–5.

42. Illumina. Illumina ® SNP Genotyping. [cited 2017 Apr 6]; Available from: https://www.illumina.com/Documents/products/workflows/workflow_goldengate_assay.pdf

43. Lewis CM, Knight J. Introduction to genetic association studies. Cold Spring Harb Protoc [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2017 Apr 6];2012(3):297–306.

44. Gomes KFB, Santos AS, Semzezem C, Correia MR, Brito LA, Ruiz MO, et al. The influence of population stratification on genetic markers associated with type 1 diabetes. Sci Rep [Internet]. 2017 Mar 6 [cited 2017 Apr 6];7:43513.

45. Biros E, Jordan MA, Baxter AG. Genes Mediating Environment Interactions in Type 1 Diabetes. [cited 2017 Mar 7];

46. Thornton AM, Shevach EM. CD4 2 CD25 2 Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. J Exp Med @BULLET [Internet]. 1998 [cited 2016 Nov 5];188(2):287–96.

47. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. Curr Opin Immunol [Internet]. 2011 Oct [cited 2017 Apr 6];23(5):613–9.

48. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell–mediated tissue damage. Nat Med [Internet]. 2007 Feb [cited 2016 Nov 5];13(2):139–45.

49. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. Gut [Internet]. 2003 Jan [cited 2016 Nov 5];52(1):65–70.

50. Sim W-Y, Lew B-L, Cho H-R, Haw S, Kim H-J, Chung J-H. Association between IL17A/IL17RA Gene Polymorphisms and Susceptibility to Alopecia Areata in the Korean Population. Gene Polymorphisms Alopecia Areata Ann Dermatol [Internet]. 2012 [cited 2016 Nov 5];24(1).

51. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. [cited 2017 Apr 6];

52. Leonard WJ, Wan C-K. IL-21 Signaling in Immunity. F1000Research [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 6];5.

53. Gabay C, McInnes IB. The biological and clinical importance of the “new generation” cytokines in rheumatic diseases. Arthritis Res Ther [Internet]. 2009 [cited 2017 Apr 6];11(3):230.

54. Sawalha AH. Epigenetics and T-cell immunity. Autoimmunity [Internet]. 2008 Jan 7 [cited 2017 Apr 6];41(4):245–52.

55. Webb R, Merrill JT, Kelly JA, Sestak A, Kaufman KM, Langefeld CD, et al. A polymorphism within IL21R confers risk for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum [Internet]. 2009 Aug [cited 2017 Apr 6];60(8):2402–7.

56. Kim MH, Bae YJ, Lee HK, Lee YR, Lee DH, Bae K, et al. Interleukin-21 receptor gene polymorphisms in Kawasaki disease. Korean Circ J [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Nov 5];43(1):38–43.

57. Voßhenrich CA., Di Santo JP. Interleukin signaling [Internet]. Vol. 12, Current Biology. 2002 [cited 2017 Apr 6]. p. R760–3.

58. Somers J, Ruttens D, Verleden SE, Vandermeulen E, Piloni D, Wauters E, et al. Interleukin-17 receptor polymorphism predisposes to primary graft dysfunction after lung transplantation. J Hear Lung Transplant [Internet]. 2015 Jul [cited 2016 Nov 5];34(7):941–9.

59. Zhang J, Xiao WX, Zhu YF, Muhali FS, Xiao L, Jiang WJ, et al. Polymorphisms of interleukin-21 and interleukin-21-receptor genes confer risk for autoimmune thyroid diseases. BMC Endocr Disord [Internet]. 2013 Jul 29 [cited 2017 Apr 6];13:26.

9 ANEXOS

Parecer da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina de São Paulo

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Variantes nos genes dos receptores das Interleucinas IL-17 e IL-21 em pacientes com Diabetes Melito Autoimune

Pesquisador: Maria Elizabeth Rossi da Silva

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 26950714.3.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 610.427

Data da Relatoria: 12/03/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa em genética humana onde os pesquisadores pretendem identificar os polimorfismos nos genes da IL-17RA, IL-21R e da cadeia gama comum e determinar a frequência destes polimorfismos na população diabética. O desenho experimental da pesquisa atende aos objetivos desta investigação e as normas éticas exigidas pela comissão.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo dos pesquisadores é identificar os polimorfismo de nucleotídeo único de relevância nos genes da IL-17RA, IL-21R e da cadeia gama comum e determinar a frequência destes polimorfismos na população diabética e controle e ainda verificar a interação de eventuais polimorfismos com genes do sistema HLA DR - DQ e auto-anticorpos pancreáticos e extrapancreáticos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto não gera riscos para o sujeito da pesquisa

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 610.427

O projeto está bem escrito, apresenta relevância científica e faz parte da linha de pesquisa dos pesquisadores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendamos sua aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 09 de Abril de 2014

Assinador por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Artigos publicados no periódico *Scientific Reports*

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

The influence of population stratification on genetic markers associated with type 1 diabetes

Received: 06 July 2016
Accepted: 26 January 2017
Published: 06 March 2017

Karla Fabiana Brasil Gomes[1], Aritânia Sousa Santos[1], Cintia Semzezem[1], Márcia Regina Correia[1], Luciano Abreu Brito[2], Marcelo Ortega Ruiz[3], Rosa Tsuneshiro Fukui[1], Sergio Russo Matioli[2], Maria Rita Passos-Bueno[2] & Maria Elizabeth Rossi da Silva[1]

Ethnic admixtures may interfere with the definition of type 1 diabetes (T1D) risk determinants. The role of *HLA*, *PTPN22*, *INS-VNTR*, and *CTLA4* in T1D predisposition was analyzed in Brazilian T1D patients (n = 915), with 81.7% self-reporting as white and 789 controls (65.6% white). The results were corrected for population stratification by genotyping 93 ancestry informative markers (AIMs) (BeadXpress platform). Ancestry composition and structural association were characterized using Structure 2.3 and STRAT. Ethnic diversity resulted in T1D determinants that were partially discordant from those reported in Caucasians and Africans. The greatest contributor to T1D was the HLA-DR3/DR4 genotype (OR = 16.5) in 23.9% of the patients, followed by -DR3/DR3 (OR = 8.9) in 8.7%, -DR4/DR4 (OR = 4.7) in 6.0% and -DR3/DR9 (OR = 4.9) in 2.6%. Correction by ancestry also confirmed that the DRB1*09-DQB1*0202 haplotype conferred susceptibility, whereas the DRB1*07-DQB1*0202 and DRB1*11-DQB1*0602 haplotypes were protective, which is similar to reports in African-American patients. By contrast, the DRB1*07-DQB1*0201 haplotype was protective in our population and in Europeans, despite conferring susceptibility to Africans. The DRB1*10-DQB1*0501 haplotype was only protective in the Brazilian population. Predisposition to T1D conferred by *PTPN22* and *INS-VNTR* and protection against T1D conferred by the DRB1*16 allele were confirmed. Correcting for population structure is important to clarify the particular genetic variants that confer susceptibility/protection for T1D in populations with ethnic admixtures.

Type 1 diabetes mellitus (T1D), which results from the autoimmune destruction of pancreatic β (beta) cells, is a polygenic disease that is influenced by both genetic and environmental contributing factors[1]. More than 60 loci are involved in susceptibility to T1D. The Major Histocompatibility Complex (IDDM1 locus) has been identified as a major determinant for genetic susceptibility to autoimmune diabetes, with the Human Leukocyte Antigens (HLA)-DR and -DQ alleles providing 40%–50% of the risk. In several countries, increased susceptibility is also conferred by differences in the variable number of tandem repeats at the 5′-end of the insulin gene (*INS-VNTR*) and polymorphisms in immune response genes, including protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (*PTPN22)* and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (*CTLA4*)[1].

T1D is more frequent in white populations, but its incidence varies in Caucasians from different countries and within the same country[2]. In Brazil, the estimated frequency of risk polymorphisms for T1D showed inter-regional differences and were usually lower than those in populations referred to as Caucasians in other countries[3–5], reinforcing the need to expand genetic predisposition studies in the Brazilian population to clarify causal variants and related ancestry. The Brazilian population was formed by a strong admixture from three different ancestral roots, i.e., Amerindians, Europeans, and Africans, thereby hindering ethnic identification (or genetic ancestry) based predominantly on skin color[6]. Another obstacle is population stratification, which arises from ethnic admixture. Subgroups that are ancestrally distinct tend to have significant representation of different genetic ancestries, which suggests that a combination of over-represented alleles in patients relative to controls

[1]Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio (LIM-18) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 455, sala 3324, 01246-903, São Paulo, São Paulo, Brazil. [2]Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Rua do Matão, 277, 05422-970, São Paulo, São Paulo, Brazil. [3]Laboratório de Imunologia, Rua Claudio Manoel da Costa, 270, Marília, São Paulo, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to K.F.B.G. (email: kfbg23@hotmail.com)

	T1D patients n(%)915	Mean ± SD	Controls n(%) 789	Mean ± SD	P[a]
Age (years)		24.6 ± 13.0		28.5 ± 11.5	<0.0001
Disease duration (years)		12.4 ± 10.6			
Age at diagnosis (years)		12.3 ± 8.4			
Gender					
Male	388 (42.4%)		477 (60.5%)		<0.0001[a]
Female	527 (57.6%)		312 (39.5%)		
BMI (kg/m^2)	21.8 ± 4.3		24.2 ± 3.5		<0.0001[b]
Self-reported skin Color					
White	729 (81.7%)		490 (65.6%)		<0.0001[a]
Brown	137 (15.4%)		208 (27.8%)		<0.0001[a]
Black	21 (2.4%)		44 (5.9%)		0.0003[a]
Yellow	5 (0.6%)		5 (0.7%)		0.7782[a]
Glycemia (mg/dL)	189.3 ± 113.7		83.5 ± 9.8		<0.0001
HbA1c (%)	8.4 ± 2.2		5.1 ± 0.4		<0.0001
HbA1c(mmol/mol)	68.3 ± 2.2		32.2 ± 0.4		<0.0001
C-peptide (ng/dL)	0.37 ± 0.31		2.21 ± 1.73		<0.0001

Table 1. Demographic data of patients with type 1 diabetes and health controls. T1D = type 1 diabetes mellitus, n = number of subjects, SD = standard deviation. [a]Fisher's exact test. [b]Student T test, HbA1c = glycated hemoglobin, BMI = body mass index.

may be due to the greater frequency of this allele in the predominant ancestral population in cases. By providing detailed information about ancestry, ancestry informative markers (AIMs) increase the ability to detect both spurious associations between population cases and controls and genetic effects with greater accuracy and precision[7].

Few studies have evaluated the genetic risks of T1D in Brazil, and none have considered ancestry. This approach, can remove the bias due to population stratification of causal polymorphisms on susceptibility to T1D. This study is the largest report of genetic markers for T1D in Brazil and can help identify T1D risk alleles, differentiating causal variants from those related to ancestry.

Statistical Analysis

The variable distributions were verified by the Kolmogorov-Smirnov test. Qualitative variables were compared using the chi-square test or the Fisher's exact test, with Woolf corrections when necessary. Numerical variables with parametric and non-parametric distributions were analyzed using Student's t and Mann-Whitney tests[8–11]. The Hardy-Weinberg equilibrium was calculated for all of the genotypes using the chi-square test. Bonferroni correction was applied for multiple tests.

The ancestral composition of the subjects in our sample was inferred using Structure 2.3[12,13]. Briefly, this program assumed the existence of K parental populations for the tested mixed population (where K was set equal to 3, based on the known European, African, and Amerindian composition of the Brazilian population) and grouped individuals with admixed proximity to each of the parental populations using Bayesian inference. Thus, the fraction of genomic contribution from European, African, and Amerindian populations was obtained for each individual.

After defining the ancestor-estimated contribution, the single nucleotide polymorphisms (SNPs) contained in the candidate genes were tested by structured association analysis using the Association Test Structured Population (STRAT) program. This program provides a statistical method for performing association mapping in structured populations assuming no stratification or conditioning for individual lines. In short, this approach allows a case-control study with correction for the biases introduced by population stratification in association studies[12]. A p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant and was equivalent to a 95% confidence level.

Results

Population characteristics. The characteristics of the groups are shown in Table 1. Patients with T1D were younger than the controls ($p < 0.0001$), with a predominance of females ($p < 0.0001$) and a lower body mass index (BMI, $p < 0.0001$). White was the most prevalent self-reported skin color in both groups; however, the diabetes group had a greater frequency of white skin color (81.7% vs. 65.6%, $p < 0.0001$ and lower frequencies of brown (15.4% vs. 27.8%, $p < 0.0001$) and black (2.4% vs. 5.9%, $p = 0.0003$) skin color than did the controls.

The average patient age at diagnosis was 12.3 ± 8.4 years and diabetes duration of 12.4 ± 10.6 years. Fasting glucose and HbA1c levels were higher ($p < 0.0001$) and C-peptide concentrations were lower ($p < 0.0001$) in patients than in the control group (Table 1).

The pancreatic autoantibodies titers were higher in patients than in controls and were as follows: GAD65A: 10.8 ± 25.4 × 0.12 ± 0.68 IU/mL; IA-2A: 3.5 ± 9.0 × 0.1 ± 0.23 IU/mL; and ZnT8A: 201.8 ± 382.6 × 3.3 ± 11.3 IU/mL ($p < 0.0001$). Pancreatic autoantibodies were also more frequent in patients: GAD65A: 47.3% × 1.5%; IA-2A: 42.5% × 1.9%; and ZnT8A: 48.9% × 1.6% ($p < 0.0001$).

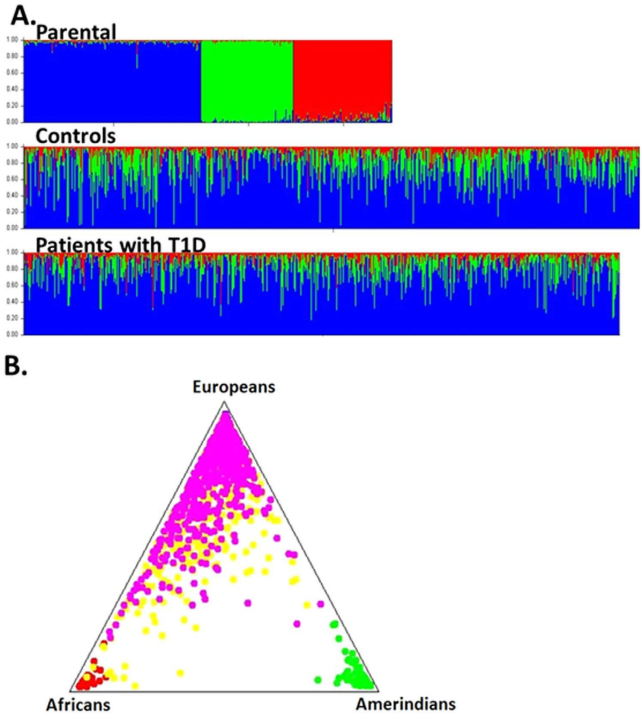


Figure 1. Graphical representations of individual contributions generated by Structure software, assuming k = 3 populations. (**A**) Bar plot showing the African (red), European (blue) and Amerindian (green) contributions. Each column represents an individual, with his grouped populations. The three groups of the first bar-plot represent the parental populations (European, African and Amerindian); (**B**) Tri-plot showing parental populations grouped at the corners and cases and controls around the triangle according to their ancestors. Pink circles represent patients with T1D and yellow circles represent control individuals.

Ancestral composition. The contribution of each of the three parental populations (European, African, and Amerindian) was obtained for both groups. T1D patients had, on average, 77% European, 15% African, and 7.3% Amerindian ancestries, whereas the healthy controls had, on average, 71% European, 21% African, and 7.9% Amerindian ancestries. The ancestral contributions are shown in Fig. 1.

HLA genes. The frequencies of the *HLA-DRB1* and *-DQB1* alleles are shown in Tables 2 and 3, respectively, and the *-DRB1/DRB1* genotypes and *-DRB1/DQB1* haplotypes are shown in Tables 4 and 5, respectively. The tables list the individual alleles, genotypes, and haplotypes that were seen at least ten times in the cases and controls. Significance levels of the allele, genotype, and haplotype associations were included, assuming no stratification and after correcting for the effects of stratification by STRAT.

The HLA-DRB1*0301, -*0401, -*0402, -*0405, and -*09 alleles were most prevalent in the T1D group in a decreasing odds ratio hierarchy: -*0405 to *0301, -*0402, -*0401, and -*09. Similarly, protection was associated with the following alleles in an increasing odds ratio hierarchy: HLA-DRB1*0302, -*15, -*10, -*14, -*11, -*13, and -*07. These results were not affected by adjustments for stratification, except allele -*16, which was initially neutral and became protective after correction (p non-structured = 0.0024, p structured < 0.001).

The risk for T1D was also conferred by HLA-DQB1*0201 (OR = 3.52) and DQB1*0302 (OR = 3.33), whereas DQB1*0602, -*0603, -*0503, -*0402 and -*0501 were protective in an increasing odds ratio hierarchy. After correction for stratification only, DQB1*0501 lost its significance as a protective allele (p non-structured = 0.0014, p structured = 0.007).

The genotype that conferred most risk (Table 4) was HLA-DR3/DR4 (OR = 16.5), which occurred in 23.9% of patients, followed by -DR3/DR3 (OR = 8.9) in 8.7%, -DR4/DR4 (OR = 4.7) in 6.0%, and -DR3/DR9 (OR = 4.9) in 2.6%. Protection against T1D was obtained by the absence of the HLA-DR3, -DR4, and -DR9 alleles (OR = 0.1). These results were unaffected by the correction for stratification.

The DRB1*0405-DQB1*0302, -DRB1*0301-DQB1*0201, -DRB1*09-DQB1*0202, -DRB1*0402-DQB1*0302, and -DRB1*0401-DQB1*0302 haplotypes were the most prevalent in the T1D group, whereas -DRB1*11-DQB1*0602, -DRB1*15-DQB1*0602, -DRB1*14-DQB1*0503, -DRB1*13-DQB1*0603, -DRB1*10-DQB1*0501, DRB1*0302-DQB1*0402, -DRB1*11-DQB1*0301, and -DRB1*07-DQB1*0202 conferred protection (Table 5). Neither the susceptibility nor the protection traits of the haplotypes was affected by the correction for stratification using STRAT, except –DRB1*07-DQB1*0201, which was included as a protective haplotype after stratification.

DRB1 alleles	T1D n (%)	Controls n(%)	OR	CI 95%	p no-structured	p structured
1	119 (8.5%)	158 (10.5%)	0.79	(0.62–1.02)	0.062	0.108
301	400 (28.7%)	121 (8.1%)	4.58	(3.68–5.69)	<0.0001	<0.001
302	1 (0.1%)	20 (1.3%)	0.05	(0.01–0.39)	<0.0001	<0.001
401	127 (9.1%)	52 (3.5%)	2.79	(2.00–3.90)	<0.0001	<0.001
402	98 (7.0%)	27 (1.8%)	4.12	(2.67–6.35)	<0.0001	<0.001
403	7 (0.5%)	11 (0.8%)	0.68	(0.26–1.76)	0.578	—
404	38 (2.7%)	21 (1.4%)	1.97	(1.15–3.37)	0.0119	0.007
405	142 (10.2%)	18 (1.2%)	9.32	(5.68–15.31)	<0.0001	<0.001
407	3 (0.2%)	8 (0.5%)	0.4	(0.1–1.5)	0.1639	0.1345
408	4 (0.3%)	7 (0.5%)	0.61	(0.2–2.1)	0.4310	0.5316
411	3 (0.2%)	9 (0.6%)	0.36	(0.09–1.32)	0.186	0.1070
7	79 (5.7%)	177 (11.8%)	0.45	(0.34–0.59)	<0.0001	<0.001
8	47 (3.4%)	85 (5.7%)	0.58	(0.40–0.83)	0.0030	0.012
9	51 (3.7%)	21 (1.4%)	2.67	(1.59–4.46)	<0.0001	<0.001
10	10 (0.7%)	33 (2.2%)	0.32	(0.16–0.65)	0.0010	0.002
11	53 (3.8%)	159 (10.6%)	0.33	(0.24–0.46)	<0.0001	<0.001
12	13 (0.9%)	24 (1.6%)	0.58	(0.29–1.14)	0.1093	0.168
13	93 (6.7%)	207 (13.8%)	0.45	(0.34–0.58)	<0.0001	<0.001
14	14 (1.0%)	70 (4.7%)	0.21	(0.12–0.37)	<0.0001	<0.001
15	28 (2.0%)	177 (11.8%)	0.15	(0.10–0.23)	<0.0001	<0.001
16	28 (2.0%)	59 (3.9%)	0.5	(0.32–0.79)	0.0024	0.001
Others	45 (3.2%)	51 (3.4%)				

Table 2. HLA-DRB1 alleles distribution in patients with type 1 diabetes and health controls. Association with Type 1 diabetes before and after correction for population stratification T1D = type 1 diabetes mellitus; n = number of individuals; OR = odds ratio; CI = confidence interval; *p* no-structured = significance level before STRAT analysis; *p* structured = significance level after STRAT analysis. Twenty-one alleles with total number in patients plus controls greater than 10 (0.4%) were included. *P* required for statistical significance after Bonferroni correction for multiple tests <0.0023. Rare alleles were included in others.

DQB1 alleles	T1D n (%)	Controls n(%)	OR	CI 95%	p no-structured	p structured
201	423 (30.8%)	156 (11.2%)	3.52	(2.88–4.31)	<0.0001	<0.001
202	94 (6.9%)	136 (9.8%)	0.68	(0.51–0.89)	0.0051	0.008
301	140 (10.2%)	189 (13.6%)	0.72	(0.57–0.91)	0.0057	0.003
302	371 (27.0%)	139 (10.0%)	3.33	(2.69–4.12)	<0.0001	<0.001
303	27 (2.0%)	32 (2.3%)	0.85	(0.51–1.43)	0.5399	0.739
319	1 (0.1%)	11 (0.8%)	0.091	(0.012–0.708)	0.0041	0.0052
401	5 (0.4%)	6 (0.4%)	0.84	(0.26–2.77)	0.7773	—
402	32 (2.3%)	81 (5.8%)	0.38	(0.25–0.58)	<0.0001	<0.001
501	134 (9.8%)	190 (13.7%)	0.68	(0.54–0.86)	0.0014	0.007
502	30 (2.2%)	51 (3.7%)	0.59	(0.37–0.93)	0.0206	0.01
503	7 (0.5%)	40 (2.9%)	0.17	(0.08–0.39)	<0.0001	<0.001
601	6 (0.4%)	8 (0.6%)	0.76	(0.26–2.19)	0.6071	0.454
602	30 (2.2%)	201 (14.5%)	0.13	(0.09–0.19)	<0.0001	<0.001
603	16 (1.2%)	90 (6.5%)	0.17	(0.09–0.29)	<0.0001	<0.001
604	47 (3.4%)	39 (2.8%)	1.23	(0.79–1.89)	0.3518	0.691
609	4 (0.3%)	12 (0.9%)	0.335	(0.108–1.042)	0.0474	
Others	10 (0.7%)	30 (2.2%)				
Total	1372	1388				

Table 3. HLA-DQB1 alleles distribution in patients with type 1 diabetes and controls. Association with Type 1 diabetes before and after correction for population stratification T1D = type 1 diabetes mellitus; n = number of individuals; OR = odds ratio; CI = confidence interval; *p* no-structured = level of significance before strat analysis; *p* structured = level of significance after strat analysis. Sixteen alleles, with total number in patients plus controls greater than 10 (0.4%), were included. *P* required for statistical significance after Bonferroni correction for multiple tests <0.003. Rare alleles were included in others.

Genotypes	T1D n(%)	Controls n(%)	OR	CI 95%	p no-strutured	p structured
DR3/DR3	61 (8.7%)	8 (1.1%)	8.88	(4.22–18.70)	<0.0001	<0.001
DR3/DR4	167 (23.9%)	14 (1.9%)	16.53	(9.48–28.85)	<0.0001	<0.001
DR3/DR9	18 (2.6%)	4 (0.5%)	4.94	(1.66–14.66)	0.0015	0.002
DR3/DRX	110 (15.8%)	120 (16.0%)	0.98	(0.74–1.30)	0.9004	0.802
DR4/DR4	42 (6.0%)	10 (1.3%)	4.74	(2.36–9.52)	<0.0001	<0.001
DR4/DR9	12 (1.7%)	5 (0.7%)	2.61	(0.91–7.44)	0.0632	0.105
DR4/DRX	181 (25.9%)	137 (18.3%)	1.57	(1.22–2.01)	0.0004	0.002
DR9/DR9	1 (0.1%)	0 (0.0%)	—	—	0.2998	—
DR9/DRX	19 (2.7%)	12 (1.6%)	1.72	(0.83–3.57)	0.1405	0.159
DRX/DRX	87 (12.5%)	440 (58.7%)	0.1	(0.078–0.13)	<0.0001	<0.001

Table 4. HLA-DRB1/DRB1 genotypes distribution in patients with type 1 diabetes mellitus and controls. Association with Type 1 diabetes before and after correction for population stratification T1D = type 1 diabetes mellitus; n = number of individuals; OR = odds ratio; CI = confidence interval; *p* no-structured = level of significance before strat analysis; *p* structured = level of significance after strat analysis. *P* required for statistical significance after a Bonferroni correction for multiple tests − <0.005.

Associations of *non-HLA genes* variants with T1D. The genotypic frequencies of the INS-VNTR polymorphic alleles CTLA4 (+49 A/G), and PTPN22 1858T are shown in Table 6. The table also shows the association tests with T1D with 95% confidence, assuming no stratification and after correcting for stratification as determined using STRAT.

The CTLA4 genotypes for the controls were not in Hardy-Weinberg equilibrium (p = 0.0001) and were excluded from further analysis, whereas the *PTPN-22* and *INS-VNTR* genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium in both groups. The *INS-VNTR* I/I genotype prevailed in patients with T1D (60.7% × 32.2% of controls) and the PTPN22-1858T: CT + TT pooled genotypes (19.0% of T1D patients × 10.6% of controls), which confer susceptibility to T1D, even after correcting for population stratification.

Discussion

T1D is a complex autoimmune disease with a strong genetic component[1,2] that is mainly related to HLA genes. HLA genes are the most polymorphic genes in the human genome, which has resulted in a widely variable distribution of HLA alleles and haplotype combinations among populations. Wide variability is also observed in other T1D-predisposing genes, including CTLA4, INS-VNTR, and PTPN22, in several ethnic groups and is likely related to different genetic backgrounds and environmental factors[1,2].

Previous studies conducted in Brazil with small sample sizes have shown inter-regional differences in the frequencies of the HLA-DR and -DQ alleles and of the other risk polymorphisms for T1D[3]. Furthermore, differences in populations referred to as Caucasian in other countries were also observed[14].

Considering that these discrepancies may result from the heterogeneity of the highly mixed Brazilian population, which may introduce bias into the evaluation of causal disease markers, we expanded our studies to a larger cohort and included a characterization of genetic ancestry to clarify the causal variants and related ancestry. This clarification is important because previous studies[6] noted a weak correlation between skin color and ancestral genomes in Brazil.

The ancestral composition of our sample was determined using Structure after genotyping 89 AIMs. To determine whether the associations of the alleles, genotypes, and haplotypes with T1D remained even after correcting for the stratification bias in our population, association tests were performed using STRAT, which uses a statistical approach for association mapping candidate genes in structured populations[12].

Analysis of the 89 AIMs confirmed the three major ancestral roots of the population in our study: European, African, and Amerindian. This result most likely reflects major milestones in our history, specifically the European colonization of Amerindians and African slaves. The highest percentage of European descent in both the T1D group and controls (77% and 71%, respectively) corroborates other reports[6]. The self-reported skin color of the patients in our study reinforces the poor correlation between color and ancestry genomics in Brazil as well as the need for ancestry characterization. The diabetes group had a higher frequency of self-reported whites (81.7% vs. 65.6%, $p < 0.0001$) and lower frequencies of browns (15.4% vs. 27.8%, $p < 0.0001$) and blacks (2.4% vs. 5.9%; $p = 0.0003$) than the controls.

Our results have few, but important, differences from those obtained for Europeans and African Americans. They suggested that the proportion of women among T1D patients (57.6% × 42.4%; $p < 0.001$) was higher than reported in the literature, which is in accordance with previous reports by our group[5] and by Gomes MB in a Brazilian multicenter study[15]. However, we cannot exclude some bias in the selection of patients as our study was not designed to estimate the disease prevalence. It is important to remember that there is no difference between genders in most series, except in populations such as those of Sardinia (Italy), Oxford (UK) and Santa Fe de Bogota (Colombia), in which the percentage of men with T1D was higher than that in women[2].

Because the frequency of the HLA-DRB1, -DQB1, and INS-VNTR alleles, as well of the PTPN22 variants, was similar between genders (data not shown), the higher frequency of T1D women in our cohort may be due to other polymorphisms, such as the T allele in the *CD226* rs763361 variant that was suggested by Mattana *et al.*[5] in the Brazilian cohort, or to environmental factors.

Haplotypes	T1D n(%)	Controls n(%)	OR	CI 95%	p no-structured	p strutured
01–0501	114 (8.3%)	142 (10.2%)	0.79	(0.61–1.03)	0.0819	0.068
0301–0201	389 (28.4%)	109 (7.9%)	4.64	(3.69–5.83)	<0.0001	<0.001
0301–0202	7 (0.5%)	4 (0.3%)	1.77	(0.52–6.07)	0.3546	—
0302–0402	0 (0.0%)	17 (1.2%)	0.29	(0.00–0.048)	<0.0001	<0.001
0401–0301	18 (1.3%)	7 (0.5%)	2.62	(1.09–6.29)	0.0251	0.107
0401–0302	105 (7.7%)	40 (2.9%)	2.79	(1.92–4.05)	<0.0001	<0.001
0402–0301	11 (0.8%)	2 (0.1%)	5.6	(1.24–25.32)	0.0116	0.008
0402–0302	87 (6.3%)	23 (1.7%)	4.02	(2.52–6.40)	<0.0001	<0.001
0403–0302	4 (0.3%)	8 (0.6%)	0.5	(0.152–1.679)	0.2555	0.2643
0404–0302	32 (2.3%)	16 (1.2%)	2.05	(1.12–3.75)	0.0178	0.002
0405–0302	110 (8.0%)	17 (1.2%)	7.03	(4.19–11.78)	<0.0001	<0.001
0411–0302	3 (0.2%)	8 (0.6%)	0.38	(0.100–1.428)	0.1359	0.1367
07–0201	16 (1.2%)	38 (2.7%)	0.42	(0.23–0.75)	0.0029	0.001
07–0202	55 (4.0%)	109 (7.9%)	0.49	(0.35–0.68)	<0.0001	<0.001
08–0301	3 (0.2%)	12 (0.9%)	0.25	(0.07–0.89)	0.021	0.067
08–0402	29 (2.1%)	58 (4.2%)	0.49	(0.31–0.78)	0.0019	0.004
09–0202	25 (1.8%)	6 (0.4%)	4.27	(1.75–10.45)	0.0005	<0.001
09–0303	17 (1.2%)	7 (0.5%)	2.47	(1.02–5.99)	0.0376	0.234
10–0501	10 (0.7%)	32 (2.3%)	0.31	(0.15–0.63)	0.0007	<0.001
11–0301	44 (3.2%)	92 (6.6%)	0.47	(0.32–0.67)	<0.0001	<0.001
11–0602	0 (0.0%)	27 (1.9%)	0.02	(0.00–0.30)	<0.0001	<0.001
12–0301	12 (0.9%)	19 (1.4%)	0.64	(0.31–1.31)	0.218	0.457
13–0301	6 (0.4%)	16 (1.2%)	0.38	(0.147–0.965)	0.0346	0.0354
13–0303	3 (0.2%)	16 (1.2%)	0.19	(0.055–0.646)	0.003	0.0041
13–0602	13 (0.9%)	15 (1.1%)	0.88	(0.41–1.85)	0.727	0.582
13–0603	17 (1.2%)	86 (6.2%)	0.19	(0.11–0.32)	<0.0001	<0.001
13–0604	46 (3.4%)	38 (2.7%)	1.23	(0.79–1.91)	0.347	0.749
13–0609	3 (0.2%)	12 (0.9%)	0.25	(0.071–0.892)	0.021	0.0321
14–0301	1 (0.1%)	9 (0.6%)	0.11	(0.01–0.88)	0.0119	—
14–0501	3 (0.2%)	9 (0.6%)	0.34	(0.09–1.24)	0.0862	—
14–0503	7 (0.5%)	38 (2.7%)	0.18	(0.08–0.41)	<0.0001	<0.001
15–0601	4 (0.3%)	7 (0.5%)	0.58	(0.17–1.97)	0.375	—
15–0602	17 (1.2%)	152 (11.0%)	0.1	(0.06–0.16)	<0.0001	<0.001
16–0301	3 (0.2%)	14 (1.0%)	0.21	(0.06–0.75)	0.008	0.005
16–0502	25 (1.8%)	42 (3.0%)	0.59	(0.36–0.98)	0.0399	0.012
Others	116 (8.5%)	189 (13.6%)				
Total	1355	1436				

Table 5. Distribution of the HLA -DRB1/DQB1 haplotypes in patients with type 1 diabetes mellitus and normal controls before and after correction for population stratification. T1D = type 1 diabetes mellitus; n = number of individuals; OR = odds ratio; CI = confidence interval; *p* no-structured = level of significance before strat analysis; *p* structured = level of significance after strat analysis. Thirty five haplotypes with total number in patients plus controls greater than 10 were included (0.4%). *P* required for statistical significance after Bonferroni correction for multiple tests <0.0013. Rare alleles were included in others.

The age at diagnosis of the T1D group was similar to that of Caucasians. The low frequency of pancreatic autoantibodies probably stems from the long duration of diabetes.

The HLA-DR and -DQ alleles and haplotypes associated with T1D susceptibility and protection had similarities to those from European and African-American patients. Aside from the high-risk alleles, including HLA-DR*0301, -*0401, -*0402, and -*0405 and DQB1 *0201 and -*302, which are usually present in both populations, the patients in our study also carried the -*09 allele, which is common in Asian and African populations but neutral in Europeans[16,17]. Despite its low frequency (3.7% in patients and 1.4% in controls), the *09 allele conferred a T1D relative risk of 2.67, thus reinforcing its importance as a risk allele for T1D. The HLA-DRB1 *0403, -*0411, -*01, and -*12 were neutral alleles, whereas the DRB1 -0302*, -*07, -*10, -*11, - *13, -*14, and -*15 and DQB1*0402, -*0503, -*0602 and -*0603 alleles conferred protection. The protection conferred by HLA-DRB1*07 was also observed in some, but not all studies conducted in Brazil, perhaps due to insufficient sample size or regional genetic differences[18].

There was a trend toward protective association with T1D by the DQB1*0301 allele (OR = 0.72; p = 0.003, non-significant). In a meta-analysis, the same allele was causal in Sweden and United Kingdom populations, but protective in Finland, Hungary and Italy[16]. The –DRB1*08 allele also showed a protection trend (OR = 0.58;

Genes	Genotypes	T1D n(%)	Controls n (%)	OR	CI 95%	p no structured	p structured
INS-VNTR	I/I	284 (60.7%)	120 (32.2%)	3.25	2.44–4.33	<0.0001	<0.001
	I/III + III/III	184 (39.3%)	253 (67.8%)				
PTPN22	cc	375 (81%)	614 (89.4%)				
(1858T)	ct + tt	88 (19.0%)	73 (10.6%)	1.97	1.40–2.75	<0.0001	<0.001
CTLA4	aa	296 (45.5%)	276 (45.0%)				
(+49 A/G)	ag + gg	355 (54.5%)	338 (55.0%)	—	—	—	—

Table 6. Genotypic frequencies of polymorphic variants related to T1D of patients with type 1 diabetes and controls before and after correction for population stratification. T1D = type 1 diabetes mellitus; n = number of individuals; OR = odds ratio; CI = confidence interval; *INS-VNTR* = variation in the number of repetitions of nucleotides 5′ of the insulin gene; *PTPN22* = tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22; *CTLA4* = Cytotoxic T lymphocyte antigen 4.

P = 0.012)[16]. This result is possibly due to its low prevalence in the population from our study (3.4% in T1D patients and 5.7% in controls).

The greatest contributor to T1D was the HLA-DR3/DR4 genotype (OR = 16.5), which was carried by 23.9% of the patients, followed by -DR3/DR3 (OR = 8.9) at 8.7%, -DR4/DR4 (OR = 4.7) at 6.0% and -DR3/DR9 (OR = 4.9) at 2.6%. The frequency of the high-risk DR3/DR4 genotype was intermediary between European (up to 40%)[16,17] and African-American patients (12%).

Despite carrying two risk alleles, the DR4/DR9 genotype did not conferred susceptibility, probably due to the small sample size, which consisted of only 12 patients and five controls. The absence of the HLA -DR3, -DR4, and -DR9 alleles demonstrated lower risk to T1D (OR = 0.1) and occurred in 58.7% of the control population and only 12.5% of patients.

The DRB1*0301-DQB1*0201, -DRB1*0401-DQB1*0302, -DRB1*0402-DQB1*0302, and -DRB1*0405-DQB1*0302 haplotypes conferred T1D predisposition, although the ORs from the DRB1*0401 and *0405 haplotypes containing DQB1*0302 were lower than those reported in European and African-American studies[16]. The DRB1*09-DQB1*0202 haplotype appears to be neutral in Europeans but to confer susceptibility in African Americans, as it was in our analysis The predisposing –DRB1*0404-DQB1*0302 haplotype in Europeans (moderate) and Africans was not confirmed in our patients (OR = 2.05; p = 0.002, not significant). By contrast, the DRB1*07-DQB1*0201 haplotype was protective in our population and in Europeans despite conferring susceptibility in Africans, whereas the DRB1*07-DQB1*0303 haplotype was previously reported to be protective only in Europeans[17].

The protective effects of the –DRB1*11-DQB1*0301, DRB113*-DQB1*0603, DRB1*14-DQB1*0503 and DRB1*15-DQB1*0602 haplotypes were present in several ethnic groups. By contrast, -DRB1*10-DQB1*0501 was protective only in the cohort from our study, whereas -DRB1*07-DQB1*0202 and –DRB1*11-DQB1*0602 were protective in the cohort from our study and in African Americans[17], and -DRB1*0401-DQB1*0301 was protective only in Europeans. The haplotypes whose effects differed greatly among European, African-American, and Brazilian cohorts had usually low frequencies (most less than 3%), thus underscoring probable differences in the genetic backgrounds.

Similar data were observed for the non-HLA-loci. The *INS VNTR* I/I genotype was more prevalent in T1D patients (60.7%) than in the control population (32.2%), yielding a relative risk of 3.2 for T1D. A study conducted in São Paulo by Hauache *et al.*[18] with fewer patients noted a greater frequency of class I alleles, comprising 83.1% of diabetics and 69.3% of controls (OR = 1.98), which is closer to the results observed in Caucasian populations. The frequency of these alleles seems to differ between racial groups. Undlien *et al.*[19] demonstrated that class I alleles confer susceptibility to T1D in the Caucasian population, but not in black and Japanese populations.

The CT + TT genotypes in *PTPN22 1858C/T* were more prevalent in T1D patients (19%) than in controls (10.6%; $p < 0.0001$), conferring susceptibility to the disease (OR = 1.97). This risk was significant only in self-reported white individuals, possibly because the T allele is very rare in African-American and Asian populations[20]. In accordance with this result, risk genotypes were present in 26.8% to 42.1% of Caucasian patients (from the USA and Finland) and 16.5% to 25.3% of controls[20].

Some degree of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium is expected in structured populations. For this reason, Hardy-Weinberg deviation analyses were performed for all alleles (HLA) and candidate polymorphisms from the entire sample. One variant of the CTLA4 gene (+49A/G) was not in Hardy-Weinberg equilibrium for the controls and was excluded from further analysis. The literature reports a predisposition in patients from Italy, the UK, and the US who carry the T allele but not in patients from Germany[21]. The T allele was present in 54.5% of patients.

In this study, we confirmed that our population is, in fact, the result of three major ancestral roots: Amerindian, European, and African. This result most likely reflects major milestones in Brazilian history, specifically the European colonization of Indigenous and African slaves. However, the majority of the patients shared a European genetic background, as previously described in a study that included various regions of the country[6]. In fact, European ancestry prevailed in both patients with T1D and the controls, followed by African and Amerindian ancestry.

The predisposition to T1D conferred by HLA-DR/DQ, *PTPN22,* and *INS-VNTR* was also confirmed in our study. The great ethnic diversity resulted in genetic determinants with intermediate frequencies between those of

Caucasians and Africans, contributing to risks and protection that were partially discordant from these groups and were likely related to the low/intermediary incidence of T1D in Brazil (8/100,000 per year)[22].

The correction for population stratification increased the statistical power of our analysis and strengthened the results. Our results highlighted the association of HLA- DRB1*16 and haplotype –DRB1* 07-DQB1*0201 with protection and set DQB1*0501 as neutral.

Our research has a number of limitations. The majority of the population in this study lives in São Paulo. Although these data cannot be extrapolated to our country, it is very representative of Brazil because São Paulo is a cosmopolitan city to which people have converged from all regions of the country as well as from Europe and Asia, with immigrants in the last century. The groups were not homogeneous regarding the mean age, skin color, gender (as stated previously) and the low BMI, which is probably related to the inadequate metabolic control of the patients. The high-resolution genotyping was performed only for the high-risk DR3 and DR4 alleles, which are fundamental to identifying individuals who may benefit from monitoring and preventive treatments and encompasses most of our population. The subtyping of -DQA1 and other neutral or protective DR alleles is important for identifying alleles that provide very strong protection against T1D and individuals who will not progress to the disease. These result are missing in our study, as well the influence of unknown environmental factors. Not all patients were positive for pancreatic autoantibody, possibly due to the cross-sectional nature of the study (implying that not all of them underwent autoantibody determinations at diagnosis) and to the fact that a small percentage of T1D patients are autoantibody negative at the time of diagnosis[2].

As the frequencies of the alleles referring to the 3 ethnic groups were a continuous, without cut-off point due to the great admixture of our population, it was not possible to define the ethnic-specific HLA alleles and haplotypes associated with T1D.

Predisposition to T1D conferred by HLA-DR/DQ, *PTPN22,* and *INS-VNTR* loci was confirmed in our study. The great ethnic diversity of the population in our study, with contributions from Europeans, Africans and Amerindians, resulted in genetic determinants for T1D with intermediate frequencies between those of Caucasians and Africans, which contributes to partial discordant risk and protection from these groups.

The correction by ancestry indicated that the DRB1*16 allele and -DRB107-DQB1*0201 haplotype were protective against T1D; that the allele DQB1 *0501, which was initially found to be protective, was actually neutral; and that the DRB1*10-DQB1*0501 haplotype was protective. The correction also confirmed that the –DRB1*09-DQB1*0202 haplotype caused susceptibility and that the –DRB1*0302-DQB1*0402, -DRB1*10-DQB1*0501, -DRB1*11-DQB1*0602 and –DRB1*13-DQB1*603 haplotypes were protective in the population, which is similar to the effects observed in African Americans, but not in Caucasians.

Methods

Casuistic. The cohort comprised 915 patients with T1D, aged 24.6 ± 13.0 years, and 789 volunteers, aged 28.5 ± 11.5 years, without family history of diabetes or any other autoimmune disease and with normal blood glucose and glycated hemoglobin levels. T1D diagnosis was based on the clinical symptoms of diabetes (weight loss, polyuria, polydipsia) or ketoacidosis at diagnosis, low C peptídeo levels (below the positive cutoff values), and the immediate need of permanent insulin therapy, according to ADA criteria[23]. More recently, the presence of at least one islet autoantibody. Autoantibody determinations started a few years ago. For this reason, many patients underwent this analysis after elapsing many years of diagnosis, explaining those autoantibody negative patients. None was obese nor had a relative with type 2 diabetes or maturity onset of diabetes of the youth (MODY).

The vast majority of patients were attended at the Clinical Hospital. A low percentage was referred by endocrinologists participants in the study. The medical records of patients always included the age at diagnosis and their clinical features. Patients who had any suspicion of non autoimmune diabetes were not included in the cohort.

Most of the cohort lived in São Paulo city. This study was conducted in accordance with ethical principles and following the guidelines contained in the Helsinki Declaration. Approval by the Ethics Committee of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and informed consent was obtained from all subjects, parents or guardians were obtained before the research procedures were initiated.

Glucose, glycated hemoglobin, and C-peptide levels. Fasting plasma glucose was determined using an enzymatic colorimetric assay (LABTEST GOD-ANA, SP, Brazil) and glycated hemoglobin (HbA1c) using high performance liquid chromatography (CLAE; normal values 4.1–6%). Fasting serum C-peptide levels were determined by radioimmunoassay (HCP-20K, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA; normal values >0.5 ng/mL; intra- and inter-assay coefficients of variation (CV) were 4.5% and 9.3%, respectively).

Autoantibodies. Serum levels of the autoantibodies against glutamic acid decarboxylase (GAD65A) and tyrosine phosphatase (IA-2A) were determined by radioimmunoassay (RSR limited, UK; CV < 7%). The normal values for 700 healthy controls (considered 3 standard deviations, SD) were <1.0 IU/mL and <0.8 IU/mL for GAD65A and IA2A, respectively. The sensitivity of both assays was 0.2 IU/mL.

Serum levels of the autoantibodies against Zinc transporter 8 (ZnT8A) were measured by ELISA (KR770-96; Kronus, USA; CV < 7%). This assay detects and quantifies autoantibodies specific to residues R325 and W325 or to non-specific variants of residue 325. The normal value of ZnT8A in 321 healthy controls was defined as ≤16 u/mL (considered 3 SD).

Molecular study. Genomic DNA was isolated from fresh peripheral blood cells using a conventional salting out method[24]. The HLA-DRB1 and -DQB1 alleles were genotyped using the Micro SSP™ Allele Generic and Specific HLA class II DNA LabType SSO typing system (One-Lambda, INC., USA). Genotypes of the class I and

III alleles for *INS-VNTR,* the *CTLA-4+* 49A/G variant in exon 1, and the PTPN22 C1858T allele were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using tHph I, BbV and Xcm I[21,25,26], respectively.

Genotyping of ancestry informative markers (AIMs). A 93 single nucleotide polymorphism (SNP) panel of ancestry autosomal markers (Supplement 1) was used to infer ancestral composition, as described by Nassir *et al.*[7]. These SNPs were obtained from 210 people from the following four populations studied in the first phase of the International HapMap Project, i.e., Nigeria (YRI), European CEPH (CEU), China (CHB) and Japan (JPT)[27], and were combined with samples from 1,043 people from 51 populations studied in the Human Genome Diversity Panel (HGDP)[28]. All of the samples are freely available online at the website for the projects[28]. These SNPs provide information on the composition of the admixed populations, including sub-Saharan African, European, and Amerindian, and provide results from structured association tests in the context of mixed population groups[7].

Genotyping of the ancestry informative SNPs was performed using the BeadXpress platform (Illumina, USA). A total of 1,284 samples (632 patients with diabetes and 652 controls) were analyzed using the Goldengate genotyping assay (Veracode, Illumina, USA) according to manufacturer's procedures. The data were examined using the Genome Studio software[29].

Quality control of samples and genotyped SNPs. To reduce the occurrence of false associations, quality control filtering of the samples and SNPs was performed by considering the genotyping efficiency (call rate >95%), gender concordance and SNP performance (SNP gene train score usually >0.90) (15). Of the 93 AIMs, four, rs11652805, rs4717865, rs6548616, and rs1950993, were excluded from the analysis owing to low performance genotyping, which resulted in 89 SNPs that were effectively analyzed.

Deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium were used as a quality control filter for the SNPs, and the 89 SNPs were all in equilibrium (>0.05).

References

1. Steck, A. K. *et al.* Type 1 diabetes mellitus of man: genetic susceptibility and resistance. *Adv Exp Med Biol*. **552,** 170–203 (2004).
2. Eisenbarth, G. S. & Lafferty, K. Type 1 diabetes: Cellular, Molecular and Clinical Immunology. Avaliable from http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/books.html. Cited 2015 may 14.
3. Silva, M. E. R., Mory, D. & Davini, E. Marcadores genéticos e autoimunes do diabetes melito Tipo 1: da teoria para a prática. *Arq Bras Endocrinol Meta*. **52/2,** 166–180 (2008).
4. Mainardi-Novo, D. T. O. *et al.* The PTPN22 1858T allele but not variants in the proximal promoter region of IL-21 gene is associated with the susceptibility to type 1 diabetes and the presence of autoantibodies in a Brazilian cohort. *Clin Exp Immunol*. **172(1),** 16–22 (2013).
5. Mattana, T. C. *et al.* CD 226 rs763361 is associated with the susceptibility to Type 1 Diabetes and greater frequency of GAD65 autoantibody in a Brazilian cohort. *Mediators of Inflammation* 694948 (2014).
6. Pena, S. D. J. *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *Plos One* **6(2),** e17063 (2011).
7. Nassir, R. *et al.* An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. *BMC Genet.* **10(39)** (2009).
8. Bussab, W. O., Morettin, P. A. *Estatística básica*, 4ª ed São Paulo, Atual Editora 321p (1987).
9. Conover, W. J. *Practical nonparametric statistics* (New York, John Wiley & Sons 1980).
10. Neter, J., Wasserman, W. & Kutner, M. H. *Applied linear statistical models* 3ª ed Homewood, Illinois, Irwin 127p (1990).
11. Winer, B. J. *Statistical principles in experimental designs* 2ª ed New York, McGraw-Hill 907p (1971).
12. Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A. & Donnelly, P. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet*. **1,** 170–81 (2000).
13. Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. **4,** 1567–87 (2003).
14. Thomson, G. *et al.* Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. *Tissue Antigens*. **70,** 110–127 (2007).
15. Gomes, M. B. *et al.* Determinants of intensive insulin therapeutic regimens in patients with type 1 diabetes: data from a nationwide multicenter survey in Brazil. *Diabetology & Metabolic Syndrome* **6,** 67 (2014).
16. Erlich, H. *et al.* HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* **4,** 1084–92 (2008).
17. Noble, J. A. *et al.* HLA Class II Genotyping of African American Type 1 Diabetic Patients Reveals Associations Unique to African Haplotypes. *Diabetes* **62,** 3292–3299 (2013).
18. Hauache, O. M. *et al.* Estimation of diabetes risk in Brazilian population by typing for polymorphisms in HLA-D-DQ, INS and CTLA-4 genes. *Dis Markers* **2,** 139–45 (2005).
19. Undlien, D. E. *et al.* IDDM susceptibility associated with polymorphisms in the insulin gene region. A study of blacks, Caucasians and orientals. *Diabetologia* (1999).
20. Zhang, Q. *et al.* Association of the PTPN22 gene (+1858C/T, −1223G/C) polymorphisms with type 1 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. **97,** 446–52 (2012).
21. Donner, H. *et al.* CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol*. **82,** 143–6 (1997).
22. Karvonen, M. *et al.* Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. *Diabetes Care* **23,** 1516–26 (2000).
23. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. Vol 38 Supplement 1 (2015).
24. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. **16(3),** 1215 (1998).
25. Benett, T. S. *et al.* Insulin VNTR allele-specific effect in type 1 diabetes depends on identity of untransmitted paternal allele. *Nat Genet.* **17,** 350–2 (1997).
26. Bottini, N. *et al.* A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet.* **36,** 337–8 (2004).
27. International HapMap Project. Available from: hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.yo. cited 2014 may 01.
28. HGDP-CEPH Human Genome Diversity Cell Line Panel. Available from: www.cephb.fr/en/hgdp/diversity.php/%E2%80%8E cited 2014 may 01.

29. Golden Gate Genotyping Assay for VeraCode Manual Protocols Illumina, Inc 2010 Catalog # VC 901-1001. Rev B. Available from: http://www.illumina.com cited 2014 may 01.

Acknowledgements
For all the staff of Carbohydrates and Radioimmunoassay Laboratory - LIM 18, Faculty of Medicine of University of Sao Paulo, especially Greci, Rodolfo, Adriana and Maria do Carmo.

Author Contributions
K.F.B.G. and M.E.R.S. designed the research; K.F.B.G., A.S.S., R.T.F., M.R.C., C.S. and M.E.R.S. conducted the research; K.F.B.G., L.S.B., S.R.M., M.R.P.B., and M.E.R.S. analyzed the data; K.F.B.G. and M.E.R.S. wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

Additional Information
Supplementary information accompanies this paper at http://www.nature.com/srep

Competing Interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Gomes, K. F. B. *et al.* The influence of population stratification in genetic markers associated with type 1 diabetes. *Sci. Rep.* **7**, 43513; doi: 10.1038/srep43513 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2017

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Importance of Zinc Transporter 8 Autoantibody in the Diagnosis of Type 1 Diabetes in Latin Americans

Received: 12 August 2016
Accepted: 13 February 2017
Published online: 16 March 2017

Karla Fabiana Brasil Gomes[1], Cintia Semzezem[1], Rodolfo Batista[1], Rosa Tsuneshiro Fukui[1], Aritania Sousa Santos[1], Márcia Regina Correia[1], Maria Rita Passos-Bueno[2] & Maria Elizabeth Rossi da Silva[1]

There is a scarcity of data of zinc transporter-8 autoantibody (ZnT8A) on mixed populations such as Brazilian. Therefore, we evaluated the relevance of ZnT8A for type 1 diabetes (T1D) diagnosis and the role of ZnT8 coding gene (SLC30A8) in T1D predisposition. Patients with T1D (n = 629; diabetes duration = 11 (6–16) years) and 651 controls were genotyped for SLC30A8 rs16889462 and rs2466295 variants (BeadXpress platform). ZnT8 triple antibody was measured by ELISA; glutamic acid decarboxylase (GAD65A) and protein tyrosine phosphatase (IA-2A) autoantibodies by radioimmunoassay. Results: Znt8A was detected in 68.7% of recent-onset T1D patients and 48.9% of the entire patient cohort, similar to GAD65A (68.3% and 47.2%) and IA-2A (64.8% and 42.4%) positivities respectively. ZnT8A was the only antibody in 8.4% of patients. Znt8A and IA2A frequencies and titers were independent of gender and ethnicity, whereas GAD65A titers were greater in females. The diabetes duration-dependent decline in ZnT8A frequency was similar to GAD65A and IA-2A. The SLC30A8 rs2466293 AG + GG genotypes were associated with T1D risk in non-European descents (56.2% × 42.9%; p = 0.018), and the GG genotype with higher ZnT8A titers in recent-onset T1D: 834.5 IU/mL (711.3–2190.0) × 281 IU/mL (10.7–726.8); p = 0.027. Conclusion ZnT8A detection increases T1D diagnosis rate even in mixed populations. SLC30A8 rs2466293 was associated with T1D predisposition in non-European descents.

The major molecular targets of type 1 diabetes (T1D) autoimmunity have been identified by islet autoantibody research in humans, providing insight into the etiology, pathogenesis, and natural history of the disease. Humoral auto-reactivity typically precedes clinical disease by months or years, and the progression to clinical manifestations is marked by intramolecular and intermolecular epitope spreading[1,2]. Beyond diagnosis, autoantibody determinations may also be useful for assessing the immunological impact of therapeutic interventions targeting autoreactive T- and B-cells[3].

Zinc transporter-8 (ZnT8), the product of the *SLC30A8* gene, is a secretory granule membrane protein of the pancreatic beta cells that was recently identified as an autoantigen in T1D[4].

Autoantibodies to ZnT8 (ZnT8A) complement the established set of type 1 diabetes-associated autoantibodies to insulin (IAA), glutamic acid decarboxylase (GAD65A), and protein tyrosine phosphatase (insulinoma-2 antigen antibody, IA-2A), which are important for predicting and confirming the T1D diagnosis[5]. ZnT8A has been detected in 60–80% of Caucasian[4–9] and 24–70% of Asian populations with T1D[10,11]. As several patients with presumed diagnosis of T1D lack GAD65A and IA2A autoantibodies, establishing the autoimmune basis sometimes becomes difficult[1]. Inclusion of ZnT8A determination reduces the proportion of patients with negative autoantibodies and increases the diagnostic sensitivity to over 90% for new onset cases of T1D in Caucasians[7,9].

It is known that genetic and environmental factors contribute to the different incidence rates and clinical characteristics of T1D among populations. The Brazilian population is one of the most heterogeneous in the world

[1]Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio –LIM 18, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Av Dr. Arnaldo 455, 01246-903, São Paulo, Brazil. [2]Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Rua do Matão, 277, 05422-970, São Paulo, São Paulo, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to K.F.B.G. (email: kfbg23@hotmail.com)

	T1D	Controls	OR (CI)	*P*
	N = 629	N = 651		
Age (years)	23 (14–33)	25 (20–35)		<0.0001
Age at diagnosis (years)	11 (6–16)			
Years of disease	11 (3–19)			
Female (%)	58.7	37.6	1.99 (1.48–2.67)	<0.0001
European Ancestry (%)	80.1	60.7	1.96 (1.42–2.72)	<0.0001
Glycemia (mg/dL)	163.0 (96–261)	84.0 (77–90)		<0.0001
HbA1c (%)	8.0 (7.0–9.6)	5.4 (5.1–5.6)		<0.0001
ZnT8Ab titer IU/mL)	14.0 (2.0–244.0)	1.0 (0.0–3.0)		<0.0001
ZnT8A frequency (%)	48.3	1.9	55.6 (29.7–104.1)	<0.0001
GAD65A titer IU/mL)	0.9 (0.2–7.2)	0.0 (0.0–0.0)		<0.0001
GAD65A frequency (%)	47.2	1.7	53.4 (28.9–98.6)	<0.0001
IA-2A titer IU/mL)	0.3 (0.1–2.9)	0.0 (0.0–0.1)		<0.0001
IA-2A frequency (%)	42.4	1.6	42.3 (22.9–78.4)	<0.0001

Table 1. Demographic and laboratory characteristics of patients with T1D and controls. Data are presented as median and (inter-quartile range). HbA1c = glycated hemoglobin; ZnT8A = Zinc transporter-8 autoantibody; GAD65A = glutamic acid decarboxylase 65 autoantibody, IA-2A = tyrosine phosphatase autoantibody.

with a wide degree of admixture, with major contributions coming from European ancestry (0.771), followed by African (0.143) and Amerindian ancestries (0.085)[12].

As data on autoimmune manifestations in the Brazilian population are scarce, the aim of our study was to estimate the prevalence of ZnT8A in T1D patients and determine the utility of ZnT8A as a T1D immunity marker, either alone in GAD65A- and IA-2A-negative subjects or in conjunction with them. The humoral response to ZnT8 was also evaluated considering the age at diabetes onset, disease duration, gender, ethnicity and *SLC30A8* variants. Variation in *SLC30A8* may affect zinc accumulation in insulin granules and the stability, storage, and secretion of insulin[13].

Amino acid changes at position 325 of ZnT8 coding gene *SLC30A8*, which are represented by arginine (ZnT8-R), tryptophan (ZnT8-W) and glutamine (ZnT8-Q), are determined by the rs13266634 and rs16889462 missense mutations[6,7], which represent three antigenic epitopes. Both SNPs are in linkage disequilibrium[14] and together with rs2466295 seem to be related to the T2D risk and response to therapy[14–16].

However, the role of *SLC30A8* in T1D predisposition is still controversial. Genome-wide association studies did not confirm the association between *SLC30A8* and T1D[17]. The CC genotype in the most studied variant of SLC30A8, rs13266634, was mainly related to a younger age at T1D diagnosis in Germany[18] and non-Swedish immigrants[19], whereas the same C allele determined higher stimulated C-peptide levels during the first year following T1D diagnosis[20]. We therefore evaluated the roles of *SLC30A8* rs16889462 and rs2466295 in T1D pathogenesis.

Results

The demographic and laboratory data of the patients with T1D and of the health controls are provided in Table 1. The age at diagnosis of T1D patients (median and interquartile range-25th and 75th) was 11 (6–16) years, and the diabetes duration was 11 (3–19 years) years.

As expected, HbA1c levels, glucose levels, islet autoantibody titers and frequencies were higher in the patients ($p < 0.001$). European ancestry and females prevailed among the T1D patients ($p < 0.001$).

ZnT8A was the only autoantibody observed in six control subjects (1.9%, 3F:3M) aged 1.9 to 27 years, who tested negative for GAD65A and IA-2A, and its frequency did not differ from that of GAD65A (1.7%) or IA2-A (1.7%) in the controls ($p > 0.05$). The normal value of ZnT8A in our cohort (n = 321) was defined as ≤16 u/mL, considering 3 SD.

Znt8A was detected in 48.9% of all patients, with median levels of 14 IU/mL (2–244). Znt8A positivity was similar to that of GAD65A (47.2%) and IA-2A (42.4%).

ZnT8A titers were similar between females and males: 12 (1–235) × 17 (2–290) IU/mL; p = 0.116 and between those of European and non-European ancestry: 12 (2–206) × 22 (2–380) IU/mL; p = 0.235. Titers of IA-2A also did not differ between females and males: 0.3 (0.12–2.87) × 0.4 (0.2–2.92) IU/mL; p = 0.384, and between whites and non-whites: 0.33 (1–2.5) × 0.4 (0.2–3.5); p = 0.168, whereas GAD65A titers were greater in females: 1 (0.25–11.28) × 0.7 (0.25–3.57) IU/mL; p = 0.022, but did not differ between those from European and non-European ancestry 0.8 (0.25–7.49) × 1.01 (0.25–6.58) iIU/mL; p = 0.779.

The frequencies of the three antibodies were independent of gender and ethnicity.

ZnT8A was similarly associated with GAD65A (30.2% of patients) and IA-2A (33.8%). Patients tested positive for ZnT8A plus IA-2A (33.8%) more frequently than for GAD65A plus IA-2A (26.7%) (OR = 1.403 (CI:1.073–1.835); Pc = 0.0396). IA-2A (but not GAD65A) positivity predicted positivity for ZnT8A (OR = 5.79; CI = 3.03-11-08; p < 0.001). There was also a positive correlation of ZnT8A levels with GADA (r = 0.307; p < 0.001) and IA2-A levels (r = 0.553, p < 0.001).

Islet Autoantibody profile over time. The frequency of the three islet autoantibodies was higher in recent-onset T1D patients and similar between them: ZnT8A (68.7%) × GAD65A (68.3%) × IA-2A (64.8%). The prevalence of all three autoantibodies declined in a similar way in the years following diagnosis and was more intense after the first year (Fig. 1). A duration-dependent decline in autoantibody titers was also observed for ZnT8A (rho = −0.44), IA-2A (rho = −0.33) and GAD65A (rho = −0.32); p < 0.001.

ZnT8A titers correlated negatively with the age at blood collection (r = −0.369; p < 0.0001) and diabetes duration (r = −0.439; p < 0.0001) but not with the age at diagnosis (r = −0.006; p = 0.91). When considering only those patients with recent diabetes onset (within less than two years of diagnosis), ZnT8A titers were negatively correlated with diabetes duration (r = −0, 273; p = 0.002) but again, not with the age at diagnosis (r = 0.017; p = 0.85).

Importance of islet autoantibodies for the diagnosis of autoimmune diabetes. ZnT8A was detected in 26.1% of T1D patients (aged 11.4 ± 6.9 years) who tested negative for other islet autoantibodies. The inclusion of ZnT8A increased the detection rate of beta-cell autoimmunity and T1D from 67.6% to 76% in the entire cohort.

Among patients who were positive for only one islet autoantibody, ZnT8A, GAD65A and IA-2A were found in 8.4%, 12.5% and 5.9%, respectively. Thus, the determination of ZnT8A allowed the additional diagnosis of T1D in 8.4% of patients. Only 7.8% of recent-onset T1D patients (within 2 years' duration) remained autoantibody-free.

Influence of SLC30A8 susceptibility on islet autoantibody frequency. The SLC30A8 rs2466293 and rs16889462 genotypic frequencies were consistent with the Hardy-Weinberg distribution and were independent of gender but not of ethnicity. Individuals of non-European descent had a lower prevalence of rs2466295 AG + GG genotypes (47.5 × 56.3%; OR = 0.423, CI = 1.108–1.828; p = 0.011) but a greater prevalence of rs16889462 AG (6.3 × 2.8%; OR = 2.329, CI = 1.295–4.189; p = 0.0073) when compared with individuals of European descent.

Further, in non-whites, the rs2466293 AG + GG genotypes were associated with risk of T1D, prevailing in patients (56.2%) when compared with controls (42.9%); p = 0.018; OR = 1.711; CI = 1.095–2.672. The GG genotype also conferred greater ZnT8A titers: 834.5 (711.3–2190) × 281 IU/mL (10.75–726.8); p = 0.027 in recent-onset T1D (<2 years of duration).

The rs16889462 variant did not influence T1D susceptibility, ZnT8 titer or frequency after regression analysis. None of the SLC30A8 variants affected the prevalence or titers of GAD65A or IA-2A or the age at onset of T1D. The median age at disease onset was between 10 and 11 years for each SLC30A8 genotype, and there was no trend for any association in the youngest group (lower than 6 years).

Discussion

The prevalence of ZnT8A in comparison with other pancreatic autoantibodies and the phenotypic characteristics of T1D patients positive for ZnT8A were determined, as well as the utility of ZnT8A as a marker of autoimmunity, either alone in antibody-negative subjects or in conjunction with GAD65A and IA2A.

Considering that the majority of studies in this field included Caucasians[4–9] or Asians[10,11], the immunogenetic profile of admixtured populations such as ours remains unclear. Therefore, this analysis can add knowledge on T1D manifestations.

European ancestry prevailed in our population. The median age at T1D diagnosis was similar to that reported for Caucasians, but the distribution of gender differed. The highest prevalence of females had already been noticed by our group[21] and by Braga *et al.*[22] in the Brazilian type 1 diabetes Study Group, which contrasts with series that did not report differences between genders or that reported an even greater frequency in men with T1D[1].

As expected, the prevalence of ZnT8A (68.7%) was higher in recently diagnosed T1D (within 2 years of diagnosis) and had the same sensitivity as GAD65A (68.3%) and IA-2A (64.8%). These data are consistent with the prevalence of ZnT8A reported in Caucasians[5,9,23,24], but greater than in those of Asian ancestry (26%)[25].

ZnT8A was also confirmed as a biomarker of T1D similar to GAD65A and IA-2A, even after many years had elapsed since diagnosis - the median diabetes duration was 11 (3–19) years. The more frequent association of ZnT8A plus IA-2A positivity in comparison with that of ZnT8 plus GAD65A, which was previously observed in new onset T1D patients[25], was maintained in our study, despite the long diabetes duration.

The frequency and titers of ZnT8A and IA-2A were unrelated to gender and ethnicity, differing from GAD65A titers which were higher in females.

The duration-time decline of the frequency of the three autoantibodies was very similar in the 30 years of follow up. After this time, approximately 20% of the patients persisted as positive for at least 1 autoantibody. There

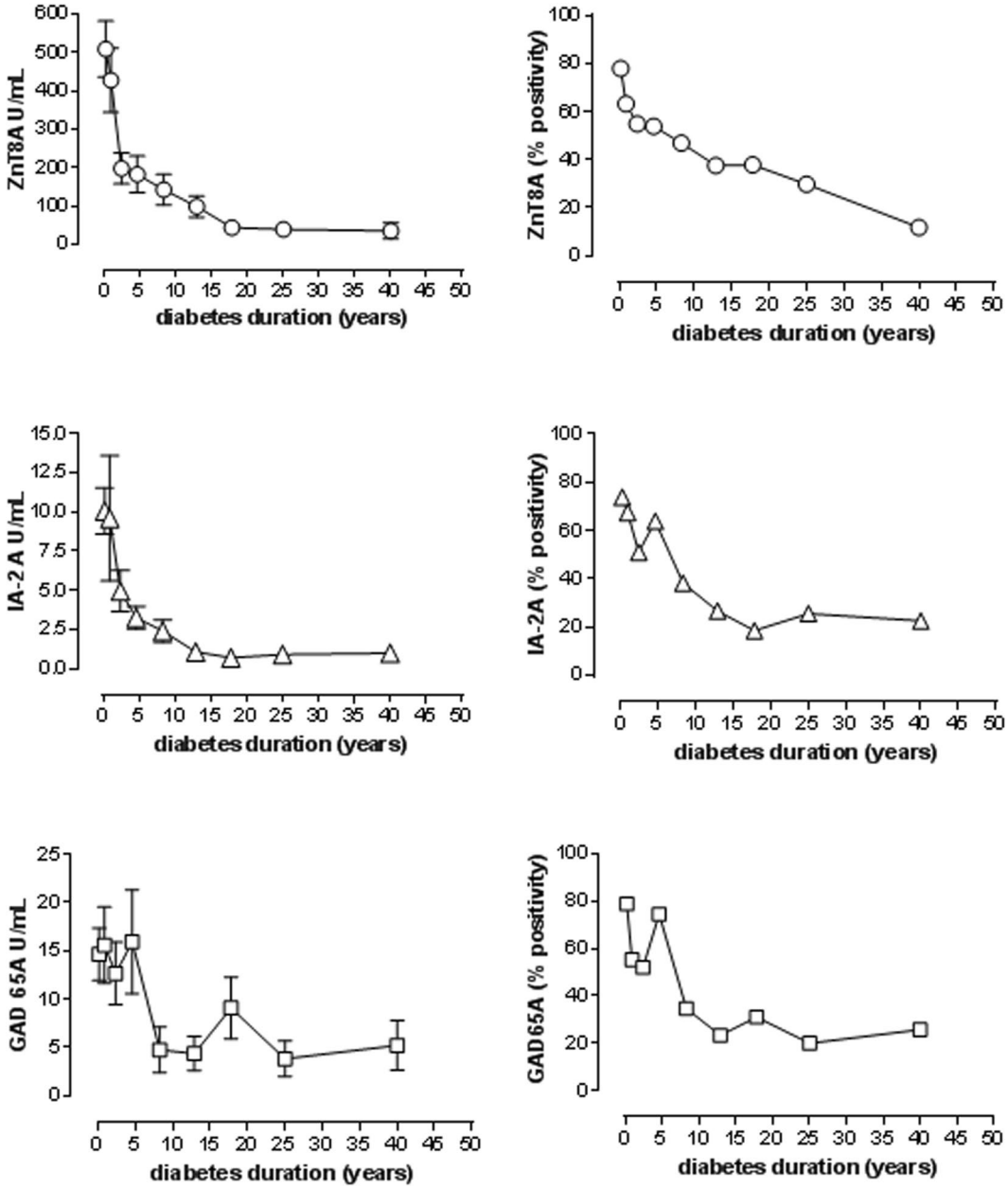


Figure 1. Mean levels (U/mL) and frequencies of autoantibodies against zinc transporter-8 (ZnT8A), glutamic acid decarboxylase (GAD65A) and tyrosine phosphatase (IA-2A) according to diabetes duration (years).

are few reports comparing the persistence of the three islet autoantibodies in such a long follow up. Wenzlau *et al.*[26] found similar data for GAD65A and IA-2A positivity, but the data were lower for Znt8A (6.7%).

In contrast, autoantibody titers followed up within 2 years of clinical diabetes onset suggested a faster decline for ZnT8A titers (72.4%) than for IA-2A (53.4%) and GAD65A (19.5%), as previously reported[24].

ZnT8A titers correlated negatively with the age at blood collection ($r = -0.369$; $p < 0.0001$) and diabetes duration ($r = -0.439$; $p < 0.0001$) but not with the age at diagnosis ($r = -0.006$; $p = 0.91$), even after considering only those patients with a recent diabetes onset.

This discrepancy might be due to the age-dependent bimodal distribution of Znt8A, which is less common among individuals aged 0–5 years[23] and those over 20 years of age at blood draw compared with those aged 6–20 years[7,9–11].

ZnT8A was detected in 26.1% of T1D patients who tested negative for the two other islet autoantibodies. The inclusion of ZnT8A in the panel of diabetes-associated autoantibodies increased the sensitivity for beta-cell autoimmunity from 67% to 76% in the entire cohort. Among patients positive for only one islet autoantibody, ZnT8A, GAD65A and IA-2A were the only detectable markers of autoimmunity in 8.4%%, 12.5% and 5.9%, respectively. Thus, the determination of ZnT8A allowed the additional diagnosis of DM1 in 8.4% of the patients. In recent-onset T1D patients, only 7.8% remained negative for the three autoantibodies. Overall, the combined

measurement of GAD, IA-2 and ZnT8 autoantibodies resulted in a diagnostic sensitivity for autoimmune diabetes of 92.2% at T1D onset. These results are in agreement with previous reports[7,9] or even slightly higher[23,25,27] particularly for Asians[25], and they confirm that the measurement of ZnT8 autoantibodies is important for the diagnosis of recent or long duration T1D patients, even in a multiethnic population

Variants of the ZnT8 coding gene, *SLC30A8*, which predisposes to T1D, have already been searched with contradictory results[18,10], whereas the rs16889462 and rs2466293 variants have been mainly related to impaired glucose metabolism and T2D risk in Europeans and Asians[14–16,28].

The SNPs rs2466293 (a 3′UTR variant) and rs16889462 (a missense variant determining a single amino acid variation at position 325 of the cytosolic segment of ZnT8, which codes for glutamine (CAG)[6,7] were not in linkage disequilibrium. Their distribution was independent of gender but not of ethnicity. Individuals of non-European descent had a lower prevalence of rs2466293 AG + GG genotypes (OR = 0.423, p = 0.011) but a greater prevalence of rs16889462 AG (OR = 2.329, p = 0.0073) when compared with individuals of European descent, as expected. The rs2466293 G allele is less common in Africans than Europeans (12% × 37%), whereas the rs16889462 A allele is nearly absent in Europeans (www.ensembl.org). This ancestry-related difference is thought to be reflected in our data.

In non-whites, the rs2466293 AG + GG genotypes were associated with T1D risk, prevailing in the patients (56.2%) when compared with the controls (42.9%, p = 0.018; OR = 1.711). The GG genotype also conferred greater ZnT8A titers: 834.5 (711.3–2190) × 281 IU/mL (10.75–726.8); p = 0.027 in recent-onset T1D (<2 years of duration). A similar trend for ZbT8A titers (not significant) was observed when analyzing the entire cohort. The decrease in beta-cell function due to the rs2466293 minor allele[28] associated with the autoimmune insult could have precipitated the diabetes manifestation in this group. Another possibility is that the SNP modulates miRNA-directed regulation of gene expression[29].

A trend toward higher frequency of anti-ZnT8A conferred by the rs16889462 AG genotype (75%) when compared with GG (46.7%) in patients with T1D was not confirmed after including gender, ancestry and diabetes duration as covariates in the analysis (p = 0.078; OR = 2.973; CI: 0.884–9.997), perhaps due to the low prevalence of the AG genotype (4.7% of patients).

Different ancestries could explain why a relationship of the variants with T1D was absent in Caucasians. These data suggest that genetic susceptibility to beta-cell dysfunction in the presence of autoimmunity may favor the progression of the disease. Linkage disequilibrium with rs13266634, linked to the specificity of ZnT8A[5,7] or with other variants related to beta-cell function, are probably implicated in our results.

None of the SLC30A8 variants influenced the prevalence of GAD65A or IA-2A or the age at onset of T1D. No genotype was associated with an early manifestation of diabetes.

Our study has limitations. Its cross-sectional nature implies that not all patients underwent autoantibody determinations at diagnosis or in the follow up. However, it is still informative considering that few studies have simultaneously compared the frequency of the three autoantibodies in such a long follow up (30 years). The groups were not homogeneous regarding age, gender, ancestry and BMI and these differences may have had an impact on the results.

Conclusion

The ZnT8A triple autoantibody assay increased the detection rate of beta-cell autoimmunity and T1D from 67.6% to 76% in the entire cohort and was the only islet autoantibody in 8.4% of the patients. The frequency of Znt8A was similar to that of GAD65A and IA-2A and was independent of gender or ethnicity. Therefore, measurements of ZnT8 autoantibodies are important for Type 1 diabetes diagnosis and can be considered a marker of T1D autoimmunity in mixed populations such as ours. SLC30A8 rs2466293 seems to predispose to T1D risk in individuals of non-European descent.

Materials and Methods

Subjects. Patients with T1D (n = 629), which was defined according to American Diabetes Association criteria[30], and healthy controls (n = 651) were analyzed. T1D diagnosis was based on the clinical symptoms of diabetes (weight loss, polyuria, polydipsia) or ketoacidosis at diagnosis; the need for permanent insulin therapy since diagnosis; and the presence of one or more islet autoantibodies. Autoantibody determinations started a few years ago. For this reason, some patients underwent this dosage many years after the diagnosis. The vast majority of patients were treated at the Clinical Hospital, and a small number of patients were referred by endocrinologists participating in the study. The medical records of patients always included the age at diagnosis and clinical features. Those who had any suspicion of non-autoimmune diabetes were not included in the cohort.

Healthy controls were also recruited in São Paulo through referrals from blood bank donors, hospital staff, the army and through announcements in the media. Healthy controls had normal blood glucose and glycosylated hemoglobin levels and no family history of diabetes or any other autoimmune disease.

Both groups were genotyped for *SLC30A8* variants (Table 1). Blood glucose, glycosylated hemoglobin and C-peptide levels were determined in both patients and controls. ZnT8 autoantibodies were determined in 414 patients with T1D and 320 healthy controls and were compared with those of GAD65A and IA-2A of 699 patients with T1D and 786 healthy controls. The approval of the Ethical Committee of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo was obtained before informed consent was signed from participants and/or parents.

The study was approved by Ethical Committee of Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and all methods were performed in accordance with the relevant ethical guidelines and regulations.

Glucose, glycosylated hemoglobin. Fasting plasma glucose was determined using an enzymatic colorimetric assay (LABTEST GOD-ANA, Brasil). HbA1c was measured using HPLC (CLAE)

Autoantibodies. Serum levels of GAD65A and IA-2A were determined by radioimmunoassay (RSR limited, UK; CV < 5.3%). The normal values of 700 healthy controls (considering 3 SD) were <1.0 IU/mL and <0.8 IU/mL for GAD65A and IA2A, respectively. Znt8A levels were measured by ELISA (Kronus, USA CV < 7%). *SLC30A8* polymorphisms at the codon for the 325th amino acid result in the expression of three ZnT8 protein variants: arginine (R)325, tryptophan (W)325 and rarely glutamine (Q)325. ZnT8 autoantibodies are directed mainly at the C terminal domain of ZnT8 (residues 268–369). This assay detects and quantifies autoantibodies specific to R325, W325 or to residue 325 non-specific variants.

***SLC30A8* genotyping.** Genomic DNA was isolated from fresh peripheral blood cells by a conventional salting-out method[31]. The rs2466293 and rs16889462 variants were genotyped by the Vera Code Golden Gate (Illumina) methodology.

Statistical analyses. The analyses were performed using SPSS® 18.0, considering a p value lower than 0.05 as statistically significant.

Genotypic frequencies were calculated by allele counting, and the Hardy-Weinberg (H-W) equilibrium for each polymorphism was tested using a Chi-square test. Autoantibody measurements were compared among genotypes using Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests. The associations between the SNPs and diabetes mellitus risk were tested under three different genetic models: Genotypic Model (AA versus Aa versus aa), Dominant Model (AA versus Aa + aa) and Recessive Model (AA + Aa versus aa).

Chi-square or Fisher's Exact tests were employed to compare the differences in the distribution of categorical variables (gender, ethnicity and genotype frequencies) between cases and controls and to associate autoantibody positivity and genotypes.

Moreover, the association between the polymorphisms and the risk of diabetes mellitus or anti-Zn positivity was estimated by odds ratios (ORs) and their 95% confidence intervals (95% CIs) using binary logistic regression analysis, which was adjusted for age, duration of disease, gender and ethnicity. Carriers of the wild-type genotype were used as a reference in this analysis.

The critical p value was corrected by Bonferroni adjustments and indicated as *Pc* for multiple tests. Non-parametric correlations (Spearman) were performed.

References

1. Eisenbarth, G.S. & Lafferty, K. Type 1 diabetes: Cellular, Molecular and Clinical Immunology. Avaliable from http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/books.html (2015).
2. Naserke, H. E., Ziegler, A. G., Lampasona, V. & Bonifacio, E. Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. *J Immunol.* **161**, 6963–6969 (1998).
3. Herold, K. C. *et al.* Immune Tolerance Network ITN007AI Study Group. Treatment of patients with new onset type 1 diabetes with a single course of anti-CD3 mAb teplizumab preserves insulin production for up to 5 years. *Clin Immunol.* **132**, 166–173 (2009).
4. Wenzlau, J. M. *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 17040–5 (2007).
5. Achenbach, P. *et al.* Autoantibodies to zinc transporter 8 and SLC30A8 genotype stratify type 1 diabetes risk. *Diabetologia.* **52**, 1881–1888 (2009).
6. Wenzlau, J. M. *et al.* A common nonsynonymous single nucleotide polymorphism in the SLC30A8 gene determines ZnT8 autoantibody specificity in type 1 diabetes. *Diabetes.* **57**, 2693–7 (2008).
7. Wenzlau, J. M. *et al.* SlC30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. *Ann N Y Acad Sci.* **1150**, 256–9 (2008).
8. Vaziri-Sani, F. *et al.* ZnT8 autoantibody titers in type 1 diabetes patients decline rapidly after clinical onset. *Autoimmunity.* **43**, 598–606 (2010).
9. Andersson, C. *et al.* BDD Study Group. Triple specificity of ZnT8 autoantibodies in relation to HLA and other islet autoantibodies in childhood and adolescent type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes.* **14**, 97–105 (2011).
10. Kawasaki, E. *et al.* 2011. Differences in the humoral autoreactivity to zinc transporter 8 between childhood-and adult-onset type 1 diabetes in Japanese patients. *Clin Immunol.* **138**, 146–53 (2011).
11. Yang, L. *et al.* The diagnostic value of zinc transporter 8 autoantibody (ZnT8A) for type 1 diabetes in Chinese. *Diabetes Metab Res Rev.* **26**, 579–84 (2010).
12. Pena, S. D. J. *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *Plos One.* **6**(2), e17063 (2011).
13. Wijesekara, N. *et al.* Beta cell-specific Znt8 deletion in mice causes marked defects in insulin processing, crystallisation and secretion. *Diabetologia.* **53**, 1656–1668 (2010).
14. Huang, Q. *et al.* Association analysis of SLC30A8 rs13266634 and rs16889462 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus and repaglinide response in Chinese patients. *Eur J Clin Pharmacol.* **66**, 1207–15 (2010).
15. Sladek, R. *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* **445**(7130), 881–5 (2007).
16. Zhang, Y. *et al.* Role of high-risk variants in the development of impaired glucose metabolism was modified by birth weight in Han Chinese. *Diabetes Metab Res Rev.* **31**, 790–5 (2015).
17. Raj, S. M. *et al.* No association of multiple type 2 diabetes loci with type 1 diabetes. *Diabetologia.* **52**(10), 2109–16 (2009).
18. Gohlke, H. *et al.* SLC30A8 (ZnT8) Polymorphism is Associated with Young Age at Type 1 Diabetes Onset. *Rev Diabet Stud* **5**, 25–7 (2008).
19. Delli, A. J. *et al.* Better Diabetes Diagnosis Study Group. Zinc transporter 8 autoantibodies and their association with SLC30A8 and HLA-DQ genes differ between immigrant and Swedish patients with newly diagnosed type 1 diabetes in the Better Diabetes Diagnosis study. *Diabetes* **61**, 2556–64 (2016).
20. Nielsen, L. B. *et al.* Study Group on Childhood Diabetes. Relationship between ZnT8Ab, the SLC30A8 gene and disease progression in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Autoimmunity* **44**, 616–23 (2011).
21. Mattana, T. C. *et al.* CD226 rs763361 Is Associated with the Susceptibility to Type 1 Diabetes and Greater Frequency of GAD65 Autoantibody in a Brazilian Cohort. *Mediators Inflamm.* 694948 (2014).
22. Braga de Souza, A. C. *et al.* Brazilian Type 1 Diabetes Study Group (BrazDiab1SG). Health-related quality of life in people with type 1 Diabetes Mellitus: data from the Brazilian Type 1 Diabetes Study Group. *Health Qual Life Outcomes.* **13**, 204 (2015).
23. Salonen, K. M. *et al.* Finnish Pediatric Diabetes Register. Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age, metabolic state and HLA DR genotype in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* **29**, 646–54 (2013).

24. Vaziri-Sani, F. *et al.* A novel triple mix radiobinding assay for the three ZnT8 (ZnT8-RWQ) autoantibody variants in children with newly diagnosed diabetes. *J Immunol Meth.* **371**, 25–37 (2011).
25. Wenzlau, J. M. *et al.* Changes in Zinc Transporter 8 Autoantibodies Following Type 1 Diabetes Onset: The Type 1 Diabetes Genetics Consortium Autoantibody Workshop. *Diabetes Care.* **38**(Suppl 2), S14–20 (2015).
26. Wenzlau, J. M. *et al.* Kinetics of the post-onset decline in zinc transporter 8 autoantibodies in type 1 diabetic human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**, 4712–4719 (2010).
27. Andersson, C. *et al.* The three ZNT8 autoantibody variants together improve the diagnostic sensitivity of childhood and adolescent type 1 diabetes. *Autoimmunity.* **44**, 394–405 (2011).
28. Billings, L. K. *et al.* Diabetes Prevention Program Research Group, Rockville. The influence of rare genetic variation in SLC30A8 on diabetes incidence and β-cell function. *J Clin Endocrinol Metab.* **99**, E926–30 (2014).
29. Goda, N., Murase, H., Kasezawa, N., Goda, T. & Yamakawa-Kobayashi, K. Polymorphism in microRNA-binding site in *HNF1B* influences the susceptibility of type 2 diabetes mellitus: a population based case–control study. *BMC Med Genet.* **16**, 75 (2015).
30. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* **38**(Suppl), S8–S16 (2015).
31. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**(3), 215 (1998).

Acknowledgements

We are grateful for the assistance of Adriana Rosa, Rodolfo Batista and Greci de Paula. This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Author Contributions

K.F.B.G. and M.E.R.S. designed the research; K.F.B.G., C.S., R.T.F., A.S.S., M.R.C., M.R.P. and M.E.R.S. conducted the research; K.F.B.G., C.S. and M.E.R.S. analyzed the data; K.F.B.G. and M.E.R.S. wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2017