ARITANIA SOUSA SANTOS

**Variantes alélicas no gene da Interleucina 27 subunidade
p28(*IL-27p28*) no diabetes mellitus tipo 1 autoimune**

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

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Aritania Sousa

Variantes alélicas no gene da Interleucina 27 subunidade p28(IL-27 p28) no diabetes mellitus tipo 1 autoimune / Aritania Sousa Santos. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Elizabeth Rossi da Silva.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo1 2.Polimorfismo genético 3.IL-27p28
4.Autoanticorpos 5.Autoanticorpos pancreáticos 6.Autoanticorpos não
pancreáticos

USP/FM/DBD-188/11

Este Trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios (LIM-18) da Disciplina de Endocrinologia e no Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2008/04472-6.

Dedicatória

*“Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus!
Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus
caminhos!*

Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas! (Rom 11:33 e 36 a)”

Ao Incomparável e Supremo Deus, dedico!

Dedicatória

Dedico em especial, à minha querida e adorável mãe Júlia que, a cada dia, me incentivou e me impulsionou, incansavelmente, a caminhar e por me fazer acreditar nos sonhos que sempre tive!

Obrigada minha mãe, por existir e por toda esta força!

Infelizmente, não tenho a presença do meu amado pai, Manoel (*in memoriam*) que se estivesse, com certeza estaria feliz por esta etapa cumprida em minha vida, mas guardarei em meu coração, todas as palavras edificadoras que me dizia, bem como, os seus ensinamentos que sempre me fizeram ultrapassar barreiras, mesmo que aos meus olhos fossem intransponíveis!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelas vidas preciosas que estão ao meu lado, e que me fazem acreditar que é possível vencer obstáculos e conquistar patamares mais altos.

Sendo assim, agradeço em especial a todos os meus familiares, pessoas especiais e amadas, que sempre tiveram, em seus lábios palavras edificadoras e otimistas e que, com certeza, me fizeram crer que tudo é possível quando se está disposto a andar, a despeito das evidências, por mais difíceis que possam ser, e acreditar que o melhor está por vir!

Agradeço à minha orientadora, Dra Maria Elizabeth Rossi da Silva, que confiou este Projeto em minhas mãos para desenvolvê-lo e por ter me dado esta oportunidade, a qual abracei com todas as minhas forças e procurei sempre dar o melhor de mim!

Obrigada por insistir quando eu queria desistir do Projeto. A Sra. foi firme e sustentou, todo o tempo, que desejava que eu avançasse e, por mais que eu apresentasse argumentos, foi incisiva em me fazer acreditar que possuía qualidades, e que precisava colocá-las em prática, pois tinha potencial para isto!

Sei que, em cada etapa que cumpri deste Projeto, sempre tive o seu incentivo! Suas palavras sempre foram importantes e as guardei em um lugar especial!

Obrigada mais uma vez, pelo apoio e carinho que dispensou a mim, todo o tempo!

Agradecimentos

Agradeço à Profa. Dra. Dalva Marreiro Rocha, a qual me incentivou e impulsionou muito a iniciar este Projeto, dizendo-me palavras sábias todo o tempo, as quais guardarei em meu coração e foram, sem dúvida, de suma importância!

Agradeço à Dra. Rosa Ferreira Santos pelas palavras de incentivo no dia-a-dia, referente ao Projeto!

Agradeço à Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, pelo suporte financeiro e apoio ao iniciar este projeto!

Agradeço a uma pessoa que no momento se encontra em outra América, mas que no meu coração está bem “pertinho”! Esta pessoa é a minha amiga querida do coração: Dra. Emília Modolo Pinto, muito presente no início deste projeto e a quem devo meu conhecimento de Biologia Molecular, Uma excelente professora!

Apreendi, portanto, a admirá-la pelo seu caráter, postura, sensatez, objetividade, profissionalismo e tantas outras características que poderia enumerá-las e que, de forma contundente, me fez acreditar que sempre poderia me superar, que nunca deveria refutar as oportunidades que surgissem, mas sim, aceitá-las, mesmo que gigantes e que, se tivesse determinação e firmeza, com certeza obteria êxito!

Agradeço-te, pois sempre pude contar com sua ajuda, mesmo de longe, seja corrigindo um “*paper*”, dando sugestões (as quais muito valiosas), ou tirando simplesmente algumas dúvidas. Não importa, você sempre se fez presente e nunca ouvi um “não” seu! Jamais me esquecerei de tudo isto!

Estou super feliz com esta nova etapa de sua vida, que você conquistou, e desejo que, em tudo, você seja próspera!

Agradecimentos

Agradeço de uma forma “muiiiiiiito” especial, uma pessoa amável e ajudadora, que considero, não simplesmente como uma pessoa que faz parte da mesma equipe de trabalho, pois você é mais que isto, é uma amiga preciosa!

Dra. Maria Edna Melo, obrigada por todas as vezes que precisei de você, e não foram poucas, e que de forma amável, sempre esteve disposta a me ajudar e nunca mediu esforços! Agradeço-te pelos conselhos, todos pertinentes, sempre que precisei! Saiba que sua ajuda, foi de extrema valia! Agradeço-te pelas orientações “Moleculares” e pela Estatística do Projeto! Conte comigo, em tudo o que precisar!

Agradeço à Rosa Fukui, farmacêutica em nosso laboratório pelas palavras animadoras em relação a este Projeto. Obrigada pelas dosagens hormonais e bioquímicas deste projeto.

Como disse no início, Deus coloca na nossa direção vidas, e de fato, deseja que o melhor aconteça conosco. Por isto tenho um coração grato, de verdade!

Agradeço à amiga e companheira de profissão (farmacêutica), que esteve comigo no laboratório, num curto período de tempo, Fernanda Beck Rossi. Não me esquecerei da preciosa ajuda na diagramação da minha Qualificação.

Agradecimentos

Agradeço também ao Christian, amigo, que não exitou em dispor de uma tarde de sábado, para colaborar, juntamente com sua esposa, Fernanda! Que o melhor venha sobre vossas vidas! Valeu demais, vocês são 10!

Agradeço à Jéssica, amiga que conheci na “pós” pelas vezes que precisei das suas idéias, ajuda e por me ouvir sempre que se fez necessário. Dividimos, algumas vezes, juntamente com a Renata, outra companheira de “pós” em nosso laboratório, o espaço físico em nossas viagens a Congressos e muitas situações engraçadas, que vivemos em lugares, como: Washington, New York, Fortaleza, São Paulo. No trabalho da Renata, minha função era de fotógrafa particular dos “ratinhos”.

Realmente, foi um tempo precioso e que deixará saudades!

Sou de fato grata à Deus pelas pessoas, as quais considero maravilhosas e especiais para mim, além de serem profissionais em suas áreas. Aprendi a tê-los de fato como amigos e sei que a recíproca é verdadeira! Obrigada pelas palavras animadoras!

Agradeço por confiarem no trabalho de minhas mãos, reconhecendo o meu profissionalismo! São os meus “amigos”, de pós-graduação: Dra.Kátia, Dra.Teresa, Dra.Lindiane, Dra.Débora e Dr.Vinícius!

Foram também companheiros de viagens a Congressos e por falar nisto, agradeço à “Lindi”, pelo tratamento VIP(06 estrelas) que tive com a Jéssica, na casa de seus pais em Fortaleza!

Muito aprendi com todos vocês durante este período em que estivemos juntos!

Agradecimentos

Sentirei saudades de todos vocês, mas, saibam que estarão para sempre em meu coração e com certeza, a distância e o tempo jamais irão apagar o carinho e respeito que tenho por todos vocês!

Foi muito bom tê-los durante esta etapa da minha vida! Desejo o melhor para cada um de vocês! E quando precisarem estarei por perto!

Agradeço à Dra Maysa (Nutricionista), a qual já finalizou seu trabalho, pelo incentivo no meu Projeto! Tivemos a oportunidade de compartilharmos de alguns momentos em viagem a Congresso e foi legal o nosso bate papo amigo, nestas ocasiões! Sei que você é uma excelente profissional! Desejo sucesso na sua trajetória!

Agradeço à Dra. Elaine e Dra. Rosária, minhas amigas, que muito me incentivaram na realização deste trabalho!

Sou grata à Dra. Elaine, pois através dos dados da sua Tese de Doutorado, muito nos ajudou, em relação aos resultados do HLA, referente aos pacientes que utilizamos em nossa casuística.

Agradeço à Dra.Luciani e à Dra."Malú", pela disponibilidade e prontidão que dispensaram, todas as vezes que precisei de ajuda durante a execução deste projeto, referente à Biologia Molecular, agradeço também à Dra.Thaís do ICR.!

Sou grata pelas orientações e sugestões que recebi na minha qualificação, de grande valia!

Agradeço à Dra."Malú" e Dra.Márcia Nery pela participação na montagem do Banco de DNA de pacientes com DM1A.

Agradecimentos

Agradeço também a pessoas valiosas e preciosas, em nosso laboratório e que, no dia a dia estavam ao meu lado, são elas: Greci (a nossa “Grecy Kelly”), Fátima (a riqueza), o que dizer dela, pois com seu “jeitinho” especial, sempre se dispôs a ajudar no que estava a seu alcance e não deixava faltar nada de material no laboratório, para trabalharmos (nossas preciosas caixinhas de ponteiras). Mas, o mais importante foram suas palavras de apoio e ânimo em todo o tempo e sei que sempre desejaram que eu obtivesse êxito, em cada etapa deste Projeto. Agradeço à Maria José, pois quando precisei de ajuda sempre foi solícita!

Só tenho a agradecer pelo carinho dispensado á mim! de todas vocês !

Agradeço à Adriana, por nos fornecer as tabelas atualizadas com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes, imprescindíveis ao Projeto!

Agradeço à Elis, colega de “pós” e responsável pelo Sequenciamento do LIM- 25 ! Valeu Elis, por todas as vezes que precisavamos dos resultados do sequenciamento para ontem e você sempre prestativa, nos ajudava nestes momentos fatídicos, bem como, pelas dicas pertinentes!

Agradeço à colega de “pós”, Aline Zamboni pelas excelentes dicas no tocante à Biologia Molecular!

Agradeço de forma especial as minhas amigas, que mesmo longe, se alegraram quando ingressei na “pós”, pelas palavras de otimismo, ânimo, incentivo e apoio durante a realização deste Projeto! São elas minhas amiguinhas “mui” queridas e preciosas do coração: Magda, Noemi, Suze, Virgínia, Rosângela, Céia, Gabi e Cida(Pós-Graduação).

Agradecimentos

Agradeço aos meus colegas de “pós”, chefia e funcionários do LIM 10, pela nossa convivência, no dia a dia, bem como, pelo apoio, carinho e pelas palavras edificadoras em relação ao projeto. Houve também alguns momentos de descontração, quando nos encontrávamos nos Congressos! São eles: Rodrigo, Rafael, Gabriela, Lúgia, Débora, Adriana, Dra.Edna, Dr.Eder Quintão, Dra.Marisa, Fabiana, Cláudia, Sérgio, Patrícia e Valéria!

Lembrarei sempre de cada um de vocês! Desejo a todos, meu companheiros de “pós”, que portas excelentes se abram!

Agradeço assim, de uma maneira em geral, á todos do Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios-LIM 18, bem como, aos funcionários do Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo desenvolvimento deste Projeto!

Agradeço aos Pacientes e ao Grupo Controle, fundamentais na realização deste Projeto!

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela concessão do Auxílio Financeiro para a realização deste projeto, sem o qual, não poderíamos executá-lo.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Listas de Tabelas

Listas de Anexos

Resumo

Summary

Introdução	29
1. História Natural do DM1	29
2. Epidemiologia do Diabetes Mellitus tipo 1 Autoimune	30
3. Fatores Ambientais e DM1	32
4. Patogênese do DM1A	33
4.1. Imunidade Celular	33
4.2. Imunidade Humoral	35
4.3. Citocinas	37
5. Genética do DM1A	38
6. Genes do Sistema HLA	38
7. Região do VNTR do Gene da Insulina	42
8. Gene CTLA-4	43
9. Gene PTPN-22	44
10. Mecanismos da Tolerância Imunológica	45
11. Ações da Interleucina 27	48
12. Justificativa do Estudo	55
Objetivos	56
Métodos	57
1. Considerações Éticas	58
2. Casuística	58
2.1. Pacientes	58
2.2. Controles	59
3. Estudo Molecular	60
3.1. Reação em cadeia da Polimerase(PCR	60
3.2. Sequenciamento automático	62
3.3. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	63
3.4. Genotipagem dos alelos HLA-DR	64
4. Avaliação Bioquímica	65
4.1. Glicemia	65
4.2. Hemoglobina Glicada	66
4.3. Autoanticorpos pancreáticos (anti-GAD-65) e (anti-IA2)	66
4.4. Autoanticorpos extrapancreáticos	67
4.4.1. Anti-enzima adrenal 21-hidroxilase (anti-21OH)	67
4.4.2. Anti-célula parietal (anti-CP)	68

4.4.3. Anti-músculo liso(AML)	68
4.4.4. Anti-microsomal de fígado e rim (anti-LKM-1)	68
4.4.5. Anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA)	68
4.4.6. Fator anti-nuclear (FAN)	68
4.4.7. Fator reumatóide (FR)	69
4.4.8. Anti-tireoperoxidase e Anti-tireoglobulina	69
4.4.9. Anti-endomísio (anti-endom)	69
4.5.0. Anti-receptor do TSH (TRAB)	69
Análise Estatística	70
Resultados	71
1. Achados clínicos	71
2. Gene <i>IL27p28</i>	72
3. Frequência das variantes alélicas no gene da <i>IL27p28</i>	76
3.1. Susceptibilidade ao DM1A	76
3.2. Sexo e Etnia	78
3.3. Idade de diagnóstico do DM1A	79
3.4. Auto-anticorpos pancreáticos e Peptídeo C	80
3.5. Autoanticorpos extra-pancreáticos	84
4. Frequência estimada dos haplotipos	87
5. Genealogia dos haplotipos (historia evolutiva)	89
6. Sistema HLA	90
Discussão	92
Conclusões	99
Anexos	100
Referência	105

Lista de Abreviaturas

A	Adenina
AML	anti-músculo liso
ANCA	anti-citoplasma de neutrófilo
<i>Annealing</i>	Pareamento
Anti-21OH	anti-21 Hidroxilase
Anti-CP	anti-célula parietal
Anti-endom	anti-endomísio
Anti-LKM1	anti-microsossomal de fígado e rim
Anti-TG	anti-tireoglobulina
Anti-TPO	anti-tireoperoxidase
APCs	células apresentadoras de antígenos
Arg	Arginina
Asp	ácido aspártico
C	Citosina
C2/C4	proteínas do complemento
CIA	artrite induzida por colágeno
CTLA-4	antígeno 4 associado ao Linfócito T citotóxico
DM1A	diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 A
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DP	desvio padrão
EDTA	ácido diaminoetanotetracético
FAN	fator anti-núcleo
FOXP3	fator de transcrição <i>forkhead box p3</i>
FR	fator reumatóide
G	Guanina
GAD65	enzima descarboxilase do ácido glutâmico
GATA 3	fator de transcrição ligado a proteína 3, específico para T _H 2
gp130	glicoproteína transdutora do sinal de 130 kDa
H ₂ O MilliQ®	água ultrapura

Lista de Abreviaturas

HbA1c	hemoglobina glicada
HLA	antígeno leucocitário humano.
HLA- DR3/DR4	antígeno leucocitário humano(alelo específico)
HPLC/ CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
HSP70	proteína do choque térmico 70
IA2	tirosina fosfatase
IAA	anticorpo antiinsulina
IC	intervalo de confiança
ICA	antiilhotas de Langerhans citoplasmático
ICOS	coestimulador induzível
IDDM1	<i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 1</i>
IDDM2	<i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 2</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INS	Insulina
JAK	<i>Janus Kinase</i> (via de sinalização)
LES	Lupus eritematoso sistêmico
Lyp	proteína linfóide tirosina fosfatase
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
NK	células exterminadoras " <i>natural killer</i> "
NO	óxido nítrico.
NOD	linhagem de camundongo não obeso diabético
OR	razão de chances, do inglês " <i>odds ratio</i> "
p28	subunidade da Interleucina 27
p35	subunidade da interleucina 12
p40	subunidade da interleucina 12
Pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
<i>Primer F</i>	iniciadores sense (Forward)
<i>Primer R</i>	iniciadores antisense (Reverse)
PTPN-22	não-receptor da proteína tirosina fosfatase tipo 22

Lista de Abreviaturas

RFLP	<i>restriction fragment lenght polymorphism</i>
ROR γ t	receptor nuclear órfão relacionado ao ácido retinóico
RR	risco relativo
STATs	transdutores de sinal e ativadores de transcrição
T	Timina
T CD4 ⁺	linfócitos T CD4 ⁺
T CD8 ⁺	linfócitos T citotóxicos
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> enzima polimerase
T-bet	fator de transcrição específico para células T _H 1
TCCR	receptor de citocina de células T – idem WSX-1
TCR	receptor de células T
TGF β	fator transformador de crescimento β
TH	T Helper
TNF	fator de necrose tumoral
TRAB	anti-receptor do TSH
Treg	células T reguladoras
UTR	região não traduzida
UV	ultra-violeta
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
WSX-1	receptor de citocina classe 1, também chamado de TCCR

Lista de Símbolos

β	Beta
α	Alfa
γ	Gama
δ	Delta
=	Igual
>	Maior
<	Menor
$\leq$	menor igual
$\pm$	mais ou menos
%	Porcentagem
N	Número
dL	Decilitro
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
ng	Nanograma
mg	Miligrama
U	Unidade
nU	Nanounidade
M	Molar
mM	Milimol
pMol	Picomol
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Na	Sódio
I ¹²⁵	iodo 125
KDa	Kilodaltons
°C	grau Celsius

Lista de Figuras

- Figura 1:** Estrutura do Maior Complexo de Histocompatibilidade (MHC) evidenciando os genes do sistema Antígeno Leucocitário Humano(HLA) de Classe I, Classe II e Classe III Eisenbarth e cols (Cell Mol Life Sci. 2007) 39
- Figura 2:** Diferentes linhagens de células T *helper* em camundongos. Percussores de célula T *helper* (T_{HP}) podem ser direcionados mutuamente para fenótipos T_H1, T_H2, T_H17 e células T regulatórias (Treg) com base no envolvimento de citocinas. Presença de interleucina (IL-12) promove direcionamento para T_H1, via transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT-4). Células T_H1 são caracterizadas pela expressão de T-bet e produção de interferon- γ e fator de necrose tumoral- α . Células T_H2 são promovidas pela IL-4 via sinalização de STAT-6 e caracterizadas pela expressão de GATA-3. Desenvolvimento dos fenótipos Treg e T_H17 requerem a presença de fator transformador de crescimento β . Este, na presença preferencial de IL-6 direciona para o fenótipo T_H17. Já células Treg expressam *Foxp3* e são estimuladas por TGF- β 46
- Figura 3:** Família da IL-12, formada pelas interleucinas IL-12, IL-23 e IL-27, apresentando suas subunidades e seus receptores(R). 49
- Figura 4:** Ilustração do cromossomo 16, com a localização do gene da *IL-27p28* e abaixo, figura representativa dos 5 exons do gene da *IL-27p28* <http://www.ensembl.org/index.html>. 60
- Figura 5:** Foto do Gel de Agarose a 2%, demonstrando o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase do gene da *IL-27p28*. 62
- Figura 6:** Foto do Gel de Agarose a 2,5%, demonstrando o tamanho dos fragmentos do gene da *IL-27p28* obtidos após a digestão pela enzima *Taq 1* no ensaio de restrição (Reação em Cadeia da Polimerase- Restriction Fragments Length Polymorphism). 64
- Figura 7:** Demonstração da região 5' proximal, regiões codificadoras e intrônicas, do gene da *IL-27p28*. 73
- Figura 8:** Localização da variante alélica não descrita no gene da *IL-27p28* na região 5' proximal: C/T 73

Lista de Figuras

- Figura 9:** Eletroferograma de parte do gene da *IL-27p28*. Painel A: paciente com DM1A sem a variante. Painel B: paciente com DM1A com a substituição de citosina por timina na posição c.-347 na região 5' proximal. As setas indicam a localização da variante. 73
- Figura 10:** Localização da variante alélica não descrita no gene da *IL-27p28* no exon 5 c.498: G/C..... 74
- Figura 11:** Eletroferograma de parte do gene da *IL-27p28*. Painel A: paciente com DM1A sem a variante. Painel B: paciente com DM1A com substituição de uma guanina por uma citosina na posição c.498 do exon 5. As setas indicam a localização da variante. 75
- Figura 12:** Análise da Proteína do gene da *IL-27p28*, composta por 243 aminoácidos, localizada no exon 5 – (resíduo 166 da sequência da proteína- posição c.498 GAG>GAC). 75
- Figura 13:** Alinhamento das sequências de aminoácidos para avaliação da conservação entre as espécies de acordo com o site de predição *Polyphen: Prediction of functional effect of human nsSNPs* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) *PolyPhen* 75
- Figura 14:** Genealogia dos haplótipos 89

Lista de Tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos selecionados para a amplificação do gene da <i>IL-27p28</i>	61
Tabela 2: Características clínicas de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controles.	71
Tabela 3: Valores laboratoriais de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controles.	71
Tabela 4: Frequências dos genótipos e alelos das variantes no gene da <i>IL-27p28</i> em portadores de DM1A e indivíduos controles.	77
Tabela 5: Frequência dos genótipos das variantes no gene da <i>IL-27p28</i> em indivíduos do sexo masculino e feminino e segundo origem étnica.	78
Tabela 6: Variantes alélicas no gene da <i>IL-27p28</i> e idade do diagnóstico de DM1A.....	79
Tabela 7: Frequências dos genótipos das variantes no gene da <i>IL-27p28</i> , e presença do anticorpo anti-GAD-65 e anti-IA2 nos pacientes portadores de DM1A com até dois anos de duração do diabetes.	81
Tabela 8: Frequências dos genótipos das variantes no gene da <i>IL-27p28</i> e valores séricos dos anticorpos anti-GAD-65 e anti-IA2 em pacientes com até dois anos de duração do diabetes.	82
Tabela 9: Frequência dos genótipos das variantes no gene da <i>IL-27p28</i> em relação à presença do peptídeo C (valores $\geq 0,5\text{U/mL}$) e seus valores séricos em pacientes portadores de DM1A com até dois anos de duração do diabetes.....	83
Tabela 10: Variantes alélicas no gene da <i>IL-27p28</i> e frequência de anticorpos extra-p pancreáticos.....	85
Tabela 11: Variantes alélicas no gene da <i>IL-27p28</i> e frequência de anticorpos extra-p pancreáticos.....	86
Tabela 12: Frequência dos haplótipos estimados.	87
Tabela 13: Frequência dos haplótipos das variantes do gene <i>IL-27p28</i> em pacientes DM1A e indivíduos controles.....	88
Tabela 14: Genótipos agrupados em relação aos clados dos pacientes DM1A e Controles.....	90

Lista de Tabelas

- Tabela 15:** Frequência dos genótipos do sistema HLA-DR em pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle..... 90
- Tabela 16:** Frequência dos genótipos das variantes no gene da *IL-27p28* em indivíduos portadores ou não dos alelos HLA –DR3 e/ou –DR4. 91

Lista de Anexos

ANEXO 1:	Aprovação da Comissão de Ética – CAPPesq	100
ANEXO 2:	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	101
ANEXO 3:	Frequência dos Genótipos e alelos das variantes no gene da <i>IL-27p28</i> em pacientes portadores de DM1A e controles.....	104

Santos, A.S. Variantes alélicas no gene da Interleucina 27 subunidade p28 (IL-27p28) no Diabetes Mellitus tipo 1 autoimune. [dissertação] São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2011.

O diabetes mellitus tipo 1A (DM1A), doença autoimune órgão-específica, resulta da destruição seletiva das células β pancreáticas produtoras de insulina pela infiltração progressiva de células inflamatórias, particularmente linfócitos T auto-reativos. O DM1A tem etiologia complexa, resultante da interação de fatores ambientais e vários genes, particularmente os do sistema HLA (alelos -DR3 e -DR4). Paralelamente, genes que codificam outros componentes da resposta imune, como as citocinas, também são fortes candidatos à predisposição à autoimunidade. Sabe-se que a intensidade da resposta imunológica tem relação com a ativação e recrutamento de linfócitos T e B, produção de citocinas e autoanticorpos, associados às respostas imunológicas T_H1 e T_H2 . Recentemente, uma nova sub-população de células T, a T_H17 , de intenso poder inflamatório, tem sido implicada em doenças autoimunes. O desenvolvimento das células T_H17 sofre influência da citocina heterodimérica IL-27, composta pelas subunidades p28 e EBI3 (proteína do gene 3 induzida pelo vírus Epstein Barr), expressa predominantemente em macrófagos ou células dendríticas. A IL-27 tem sido associada à doença de Crohn, encefalomielite experimental autoimune e diabetes autoimune em camundongos. O seu bloqueio retarda o aparecimento do diabetes nestes animais. A implicação da IL-27 no DM1A em humanos é pouco conhecida. O presente estudo tem como objetivo pesquisar mutações ou polimorfismos na região 5' proximal e regiões codificadoras do gene da *IL-27p28* e sua possível associação com predisposição ao DM1A. Estas regiões foram amplificadas pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e submetido ao seqüenciamento automático e PCR-RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphisms*) utilizando DNA genômico obtido de leucócitos de sangue periférico. A casuística envolveu 614 indivíduos, sendo 318 pacientes portadores de

RESUMO

DM1A (idade $19,6 \pm 11,2$ anos, 129M/189F), caracterizados por apresentarem hiperglicemia e necessidade precoce de insulino-terapia e um grupo controle, com 296 indivíduos saudáveis (idade $30,3 \pm 13,2$ anos, 131M/165F), com glicemia de jejum e HbA1c normais. Na análise dos resultados do sequenciamento, observamos oito variantes alélicas, seis delas já descritas na literatura. As duas novas variantes alélicas causaram a substituição de uma citosina por uma timina na posição c.-347 C>T na região 5' proximal e a substituição de uma guanina por uma citosina no exon 5, na posição c.498 G>C, levando à mudança do aminoácido, de ácido glutâmico para ácido aspártico no resíduo 166 da sequência da proteína. A distribuição dos genótipos na população estudada foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genotípicas e alélicas destas variantes não diferiram entre portadores de DM1 A e controles. Não encontramos associação destas variantes com sexo e grupo étnico nos dois grupos e, com idade de diagnóstico do diabetes, presença de auto-anticorpos pancreáticos e extra-pancreáticos no grupo com DM1A. Não houve diferença na frequência dos haplótipos estimados entre os pacientes DM1A e grupo controle. Sendo assim, nossos resultados sugerem que variantes alélicas no gene da IL-27p28 não estão implicadas na susceptibilidade ao DM1A na nossa população.

Descritores: 1.Diabetes *mellitus* tipo 1 2.polimorfismo genético 3.IL-27p28
4.Autoanticorpos 5.Autoanticorpos pancreáticos 6.Autoanticorpos extrapancreáticos

SUMMARY

Santos, A.S. Allelic variants in the Interleukin-27 p28 subunit gene in type 1 diabetes. [dissertation]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2011.

Type 1A diabetes mellitus (T1D), an organ-specific autoimmune disease, results from the selective destruction of insulin-producing pancreatic β cells by progressive infiltration of inflammatory cells, particularly autoreactive T lymphocytes. The complex etiology of T1D includes the interaction of environmental factors and multiple genes, particularly those of the HLA system (DR3 and DR4 alleles). In parallel, genes encoding other components of the immune response, such as cytokines, are also strong candidates for predisposition to autoimmunity. It is known that the intensity of immune response depends on the activation and recruitment of T and B lymphocytes, production of cytokines and autoantibodies, related to TH1 and TH2 immune responses. Recently, a new subpopulation of T cells exhibiting intense inflammatory activity, the TH17 subset, has been implicated in autoimmune diseases. The development of TH17 cells is influenced by IL-27, a heterodimeric cytokine composed of p28 and EBI3 (Epstein-Barr Virus-induced gene 3 protein) subunits, expressed predominantly in macrophages or dendritic cells. IL-27 has been associated with Crohn's disease, experimental autoimmune encephalomyelitis and autoimmune diabetes in mice. IL-27 blockage delays the onset of diabetes in these animals, but the role and involvement of IL-27 in T1D in humans has not yet been reported. The aim of this study was identify mutations or polymorphisms in the coding regions and boundary intron sequences of IL-27p28, including the 5' proximal region, and their possible association with the disease. Those regions were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) and the polymorphisms determined by automatic sequencing and PCR-RFLP (Restriction Fragment length polymorphisms) The cohort involved 614 individuals - 318 patients with T1D (19.6 ± 11.2 years of age, 129M/189F) and 296 control subjects (30.3 ± 13.2 years of age, 131M/165F) with normal fasting glucose. We identified eight allelic variants in the 5' proximal and coding regions of *IL-27p28*, six of them already described in database repositories. The two new

SUMMARY

allelic variants were: the substitution of a cytosine by a thymine at position c.-347 C>T of the 5' proximal region and the substitution of a guanine by a cytosine in exon 5, at position c.498 G>C, determining a change in the aminoacid sequence of the protein at residue 166 from glutamic acid to aspartic acid. The genotypic frequencies of these variants were in Hardy-Weinberg equilibrium in both groups. The frequency of the alleles and genotypes did not differ between T1D patients and controls. There was no association between IL-27p28 variants with gender or ethnical origin in the population analyzed. Also, no association was found between these variants with age at diagnosis of diabetes nor with the presence of pancreatic and extrapancreatic autoantibodies in T1D patients. The frequency of the estimated haplotypes were similar between groups. Our results suggest that allelic variants in the *IL-27p28* gene are not involved in susceptibility to T1D in our population.

Descriptors: 1.type 1 A diabetes 2.Genetic polymorphism 3.IL-27p28
4.Autoantibodies 5.Pancreatic a autoantibodies 6.Extrapancreatico autoantibodies

INTRODUÇÃO

1. História Natural do DM1

O diabetes mellitus tipo 1A (DM1A) é uma doença metabólica crônica autoimune, órgão específica, caracterizada pela deficiência de insulina decorrente da destruição das células β do pâncreas^{1,2}. O grau de destruição celular é variável. É rápido e intenso em crianças e adolescentes, resultando na necessidade precoce e permanente do tratamento com insulina e risco de cetoacidose, ou é de instalação mais lenta, em adultos, que podem reter a função residual das células- β por até alguns anos após o diagnóstico. É caracterizado pela presença de autoanticorpos contra antígenos pancreáticos³, níveis elevados de glicose e distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas^{2,4}, os quais acarretam alterações estruturais em diversos órgãos e sistemas, incluindo a microangiopatia (retinopatia, nefropatia), a macroangiopatia (doença coronariana, insuficiência arterial periférica e do sistema nervoso central) e a neuropatia⁵. O DM1A é considerado uma das doenças crônicas mais comuns em crianças e adultos jovens, e acomete cerca de 0,3% da população caucasiana⁶.

É uma doença multifatorial, dependente da complexa interação entre resposta imunológica, fatores genéticos predisponentes e influência do meio ambiente⁷.

Embora a sua instalação clínica costume ser abrupta, a evolução da doença não é aguda, como se admitia previamente, e sim um processo de auto-agressão lento, que se desenvolve numa fase pré-clínica, de duração de vários anos⁴. Por ocasião do diagnóstico, na presença de hiperglicemia e cetose, as células secretoras de insulina já estão em número reduzido ou ausentes².

O infiltrado inflamatório do tipo linfomononuclear, configurando a insulite e a escassez ou a ausência de células β caracterizam o quadro histológico do DM1A. As células secretoras de outros hormônios, como o

glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, também presentes nas ilhotas pancreáticas, são poupadas².

A história natural do DM1A inclui quatro estágios distintos: I – pré-clínico: auto-imunidade dirigida contra as células β , com diminuição progressiva da resposta insulínica aguda à glicose intravenosa ou oral; II – início do diabetes clínico; III – remissão transitória; IV – diabetes associado a complicações agudas e crônicas⁸.

O estágio pré-clínico é definido pela presença de autoanticorpos contra constituintes da célula β pancreática, que reforçam o papel da autoimunidade na etiopatogenia do DM1⁹.

O DM1A é frequentemente associado à doença autoimune tireoidiana, doença celíaca, doença de Addison e várias outras doenças autoimunes, caracterizadas por autoanticorpos órgãos-específicos, os quais são relacionados aos mesmos determinantes genéticos. Esses anticorpos são úteis na detecção de autoimunidade órgão-específica antes do aparecimento da manifestação clínica, prevenindo comorbidades³.

2. Epidemiologia do Diabetes Mellitus tipo 1 Autoimune

O DM1A compreende 90% dos casos de diabetes da infância e 5 a 10% daqueles de início na idade adulta, sendo que 40% do DM1A ocorre até os 20 anos de idade¹⁰. A idade de diagnóstico é mais freqüente entre 8 e 13 anos de idade¹⁴ e sua prevalência é inferior a 1%³.

Predomina na raça branca, porém sua incidência é variável entre populações e áreas geográficas, refletindo diferenças entre *background* genético e fatores ambientais desencadeantes. As maiores taxas de incidência mundial (superiores a 35/100.000/ano) ocorrem na Finlândia e na Sardenha (Itália), seguidas por populações caucasianas na Europa e na América do Norte, de incidência moderada (cerca de 10-20/100.000/ano). Finalmente os países asiáticos e a grande maioria dos países da América do

Sul apresentam as menores taxas mundiais (inferiores a 5/ 100.000/ano). No Brasil, a incidência é de 8/ 100.000/ano^{11,12}.

A incidência anual de DM1A está aumentando em 3,2% nos indivíduos mais jovens, principalmente naqueles com início antes dos 4 anos de idade, sugerindo fator ambiental atuante^{13,14}.

Em 609 pacientes DM1A analisados na cidade de São Paulo, no HC-FMUSP (Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), a idade de diagnóstico foi semelhante à dos caucasianos e houve predomínio da raça branca: 81,7% brancos e 18,3% não brancos¹⁵.

O DM1A incide igualmente nos sexos masculino e feminino, mas nos países com alta prevalência da doença, predomina nos homens com diagnóstico após os vinte anos de idade¹³. A agregação familiar é baixa, mas superior à da população normal, sendo o risco para diabetes de 1,3% nos pais, 4,2% nos irmãos e 1,9% nos filhos de diabéticos.

A transmissão paterna do diabetes para os filhos é maior que a materna¹¹. A concordância entre gêmeos monozigóticos (50%) difere acentuadamente em relação aos dizigóticos (5%). A probabilidade do gêmeo discordante desenvolver a doença diminui com a duração da discordância, mas pode ocorrer até 40 anos após. O risco para diabetes no gêmeo dizigótico é semelhante ao dos outros irmãos, sugerindo que o ambiente compartilhado pelos gêmeos dizigóticos não parece aumentar o risco de diabetes¹⁴. A análise global destes dados epidemiológicos evidencia a clara interação entre patrimônio genético e ambiente³.

3. Fatores Ambientais e DM1

A expressão aberrante de antígenos HLA sobre a superfície de células-alvo é um fator importante no desenvolvimento da auto-imunidade, que surge quando ocorre uma falha nos mecanismos responsáveis por manter as células T auto-reativas sob controle^{2,7,8}. Nessa situação, as células T auto-reativas podem ser ativadas por moléculas HLA que expressam antígenos próprios. O mecanismo que desencadeia esta perda de controle “gatilho” ainda é desconhecido para, praticamente, todas as doenças autoimunes. Existem evidências que, em alguns casos, infecções virais ou bacterianas, através do mecanismo de mimetismo molecular entre antígenos do patógeno e antígenos do hospedeiro, possam levar à formação de anticorpos contra tecidos próprios⁷.

De acordo com Atkinson e Einsenbarth, os agentes ambientais agem como modificadores da patogênese, podendo servir como “gatilhos”¹⁶.

Os determinantes ambientais mais estudados no DM1A podem ser classificados em 3 grupos: infecções virais (citomegalovírus, rubéola, caxumba, sarampo); dieta: deficiência na suplementação de vitamina D, amamentação *versus* introdução precoce do leite de vaca, cereais e glúten) e toxinas (por exemplo, derivados de compostos N- nitroso). Outros fatores não genéticos modificadores da doença incluem administração de vacinas, estresse emocional, influências climáticas, sazonalidade, agentes sanitários e acesso aos cuidados de saúde^{7,8,16}.

4. Patogênese do DM1A

4.1. Imunidade Celular

O processo de destruição das células β pancreáticas decorre da agressão imunológica mediada por células linfocitárias, macrófagos e células *NK* (*natural killer*), sendo assim um processo dependente da imunidade celular².

Os linfócitos são as células responsáveis pela resposta imune específica. Estas células, capazes de reconhecer e distinguir determinantes antigênicos específicos, dividem-se em duas classes ou subtipos principais; linfócitos B (responsáveis pela produção de anticorpos) e linfócitos T (medeiam e participam da resposta celular específica), os quais compreendem duas populações distintas: os linfócitos T auxiliares (CD4 ou “*Helper*”) e os citotóxicos (CD8).

Os linfócitos T só reconhecem como antígenos os peptídeos associados às proteínas do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC). Desta forma, os linfócitos T se comportam como células cuja ativação é antígeno específica e MHC restrita.

Já as células “*Natural killer*”, ou células *NK*, não apresentam marcadores de linfócitos T ou B e são responsáveis pela lise de células tumorais ou infectadas por vírus, sem que haja estímulo antigênico específico².

Nos camundongos NOD (*non-obese diabetes*), modelo animal de diabetes autoimune, a destruição das células produtoras de insulina mimetiza aquela observada em humanos^{17,18,19}. Assim, análises imunohistoquímicas de tecido pancreático revelam que os primeiros tipos celulares a infiltrarem as ilhotas de Langerhans são as células dendríticas e os macrófagos, promovendo a insulite.

A apresentação de autoantígenos específicos das células β pancreáticas pelos macrófagos e /ou células dendríticas para os linfócitos T $CD4^+$ é o primeiro evento no processo de auto-imunidade no DM1²⁰.

Ativados, os macrófagos secretam citocinas que induzem a migração celular e estimulam vários tipos celulares a secretarem radicais livres, extremamente tóxicos às células β pancreáticas. Durante o processo de insulite, que parece ocorrer com maior intensidade em ilhotas onde existam células β metabolicamente ativas, os linfócitos T $CD8^+$ são as células predominantes. Tais linfócitos, após o reconhecimento dos auto-antígenos pancreáticos, efetuam a destruição das células β por citólise, através da liberação de perforinas e granzimas, e também por indução de apoptose. Dessa maneira, macrófagos, linfócitos T $CD4^+$ e linfócitos T $CD8^+$ atuam sinergicamente na destruição das células β pancreáticas^{21,22}.

Pesquisadores têm demonstrado, em tecido pancreático de animais diabéticos, o aumento da expressão de moléculas apresentadoras de antígeno (MHC) tanto as de classe I, que apresentam antígenos preferencialmente aos linfócitos $CD8^+$ citotóxicos, quanto as de classe II, que os apresentam preferencialmente aos linfócitos $CD4^+$ ^{21,23}.

Na migração das células inflamatórias para o local afetado, ocorre a importante participação das moléculas de adesão, particularmente as integrinas e selectinas²⁴, cuja expressão, aumentada nas células endoteliais e linfocitárias no diabetes, facilita o processo de marginação nos capilares sanguíneos e posterior migração para o tecido de células linfocitárias e demais células constituintes do mecanismo de inflamação²⁴.

O linfócito T $CD4^+$, após sua ativação, produz várias citocinas que promovem a proliferação e diferenciação de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos.

Estudos utilizando camundongos NOD têm demonstrado que o perfil de secreção de citocinas durante o desenvolvimento do diabetes tipo 1 é de padrão T_H1 , onde se tem como principal constituinte a IL-2, o fator de necrose tumoral (TNF) e os interferons (IFNs). A participação dos radicais

livres na lesão do pâncreas e o desencadeamento do diabetes tipo 1 também é um aspecto importante, sendo o principal exemplo o óxido nítrico (NO), presente nos macrófagos e tecido pancreático de camundongos NOD²⁵.

4.2. Imunidade Humoral

O antígeno específico da célula β , alvo inicial do sistema imune, não está definido, mas os autoanticorpos contra vários componentes das células β (imunidade humoral), presentes no soro de pacientes diabéticos recém-diagnosticados e de indivíduos que posteriormente desenvolvem a doença, são importantes marcadores da progressão da mesma^{12,13,26}.

A produção de anticorpos pelos linfócitos B não parece ser apenas secundária à destruição das células β e ao estímulo pelos linfócitos T. As células β também agem como apresentadoras de antígeno, necessário à expansão eficiente de células T CD4⁺ auto-reativas diabetogênicas. Assim, no DM1A, além da perda da tolerância pelas células T, há também perda da tolerância pelas células B, que expressam imunoglobulinas auto-reativas. A presença de autoanticorpos contra vários tecidos no DM1A pode ser resultado dessa alteração.

Os marcadores humorais mais frequentes da agressão imune são os anticorpos antiinsulina (IAA), antiilhotas de Langerhans citoplasmático (ICA), antienzima descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e antiproteína de membrana com homologia às tirosino - fosfatases ou anti-antígeno 2 do insulinoma (anti-IA2). Os autoanticorpos são raros na população controle não diabética – frequência de 2 a 5%^{12,13,26}.

O ICA é um anticorpo da classe IgG, policlonal, que não é dirigido contra um antígeno específico das células β , mas a uma ou várias estruturas celulares ao mesmo tempo (GAD65, IA2 e outros antígenos).

O IAA predomina nas crianças, particularmente nas do sexo masculino, sendo menos frequente em adultos, nos quais têm baixa sensibilidade diagnóstica (10%). É também encontrado no soro de pacientes usuários de insulina (7 a 10 dias após o início do tratamento) e nestes casos, não serve como marcador^{12,13,26}.

O anti-GAD65 é frequentemente associado a outras doenças autoimunes além do diabetes e sua presença, não necessariamente implica em progressão rápida para a doença. Mantém sensibilidade de 70% a 80% para o diagnóstico de diabetes autoimune, independentemente da idade¹³.

O anticorpo anti-IA2 é mais comum entre indivíduos jovens (até 15 anos de idade) e indica rápida progressão para o diabetes manifesto^{12,13,26}. Diferentes isoformas do IA-2 no timo e no baço, comparadas à do pâncreas, podem induzir autoimunidade à seqüência IA-2 não presente nos tecidos linfóides²⁷.

Os autoanticorpos, em altos títulos ao diagnóstico, tendem a desaparecer com o tempo, à exceção do anti-GAD65. Davini et al.²⁸, no HC-FMUSP, observaram altos títulos e maior frequência de autoanticorpos (2-3 autoanticorpos positivos) nos primeiros cinco anos de duração da doença. Já os títulos de anti-GAD65 se mantiveram mais constantes com a progressão da doença. Anti-IA2 predominou nos portadores dos alelos HLA-DRB1*04 e DQB1*0302.

Estudos recentes descreveram a possibilidade de se detectar uma população de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 1 utilizando a presença de auto anticorpos séricos contra múltiplos antígenos pancreáticos. Estes estudos encontraram relação entre a presença de dois ou mais autoanticorpos e o desenvolvimento de diabetes em indivíduos com familiares diabéticos²⁹ e mesmo em indivíduos sem antecedente familiar de diabetes tipo 1, os quais correspondem a 90% dos casos de diabetes tipo 1³⁰.

4.3. Citocinas

As citocinas são uma família de proteínas que medeiam muitas respostas da imunidade inata e adaptativa e são produzidas por diversos tipos celulares em resposta a estímulos inflamatórios ou antigênicos. Geralmente atuam localmente, de modo autócrino ou parácrino, embora certas citocinas sejam produzidas em quantidade suficiente para circular e exercer ações endócrinas. As citocinas ligam-se com alta afinidade a receptores que pertencem a um número limitado de famílias estruturais, utilizam vias de sinalização especializadas, tais como a via *Janus Kinase*(JAK) e a de transdutores de sinal e ativadores de transcrição(*STATs*) e desempenham muitas funções que são críticas para a defesa do hospedeiro contra patógenos. Contribuem ainda para a especialização da resposta imune mediante a ativação de diferentes tipos de células, ampliando os mecanismos efetores para eliminar os antígenos.

A secreção de citocinas é um evento breve, autolimitado. Geralmente elas não são armazenadas como moléculas pré-formadas e suas sínteses são iniciadas por novas transcrições gênicas, como resultado da ativação celular.

Dentre as citocinas, as interleucinas (IL) são proteínas de baixo peso molecular, produzidas por leucócitos, que se ligam a receptores na superfície celular e atuam de forma autócrina e/ou parácrina nos próprios leucócitos. Induzem fatores que modificam o programa de diferenciação celular (seleção natural, proliferação, maturação, indução ou proteção contra apoptose) das células alvo às quais se ligam.

Muitas das alterações na expressão gênica induzidas por citocinas resultam na diferenciação de linfócitos T e B e na ativação de células efetoras, tais como macrófagos.

As citocinas que participam da imunidade inata a diferentes classes de microrganismos são produzidas principalmente por macrófagos ativados e

incluem as seguintes: o TNF e a IL-1; as quimiocinas; a IL-12; os IFNs tipo I e a IL-10.

As citocinas que regulam as respostas imunes adaptativas são produzidas principalmente por linfócitos T estimulados por antígenos, e incluem as seguintes: a IL-2, a IL-4, a IL-5, o IFN- γ e o Fator Transformador de Crescimento- β (TGF- β)³¹.

5. Genética do DM1A

Foram descritos mais de vinte *loci* que conferem susceptibilidade ao DM1A, denominados IDDM, estando os mais importantes localizados nos cromossomos 6, 11, 1 e 2^{12,27,32,33,48}.

6. Genes do Sistema HLA

A região do sistema Antígeno Leucocitário Humano (HLA), localizada no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), situa-se no braço curto do cromossomo 6 (p21.3), e constitui o principal *locus* diabetogênico ou de susceptibilidade para o diabetes tipo 1, denominado IDDM-1 (40-50% de risco para agregação familiar de DM tipo 1). O MHC apresenta 3 classes de alelos intimamente relacionados^{12,48}.

As moléculas de classe I do sistema HLA (HLA-A, -B e -C) expressas na maioria das células somáticas, estão envolvidas no processamento e apresentação de antígenos intracelulares. São compostas por duas cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente, codificadas pelos genes A, B e C do cromossomo 6 (cadeia α) e gene do cromossomo 15 (cadeia β 2-microglobulina)^{12,48}.

As moléculas de classe II do sistema HLA são expressas em um grupo de células do sistema imune, incluindo monócitos/macrófagos, células dendríticas, epiteliais tímicas, linfócitos B e linfócitos T ativados, e atuam no processamento de proteínas extracelulares. São compostas de duas cadeias

polipeptídicas associadas não-covalentemente, a cadeia α (32 a 34kD) e a cadeia β (29 a 32kD), ambas codificadas por genes do MHC.

Ambas moléculas de classe I e II estão envolvidas com a resposta imune adaptativa pela apresentação de peptídeos patogênicos às células T. Entre as regiões de classe I e classe II encontra-se a região denominada classe III, na qual são codificadas outras proteínas também importantes para a resposta imune, mas que não são antígenos de membrana celular e não são polimórficas, a saber: proteínas do choque térmico (HSP70), proteínas do complemento (C2 e C4) e proteína do Fator de Necrose Tumoral (TNF)³¹. (Figura 1)

Figura 1: Estrutura do Maior Complexo de Histocompatibilidade(MHC) evidenciando os genes do sistema Antígeno Leucocitário Humano(HLA) de Classe I, Classe II e Classe III. Eisenbarth e cols (Cell Mol Life Sci. 2007)

Todo processo de reconhecimento imunológico se faz por meio da interação do receptor para antígenos do linfócito T com moléculas do MHC que apresentam o fragmento de uma proteína (peptídeo). As moléculas do MHC (classe I ou II) posicionadas na superfície celular, albergando os peptídeos antigênicos, formam o complexo que será reconhecido pelos receptores da célula T (TCR) como próprios ou não-próprios. O TCR está ligado não-covalentemente às proteínas CD3 formando o complexo TCR, o qual liga-se aos complexos peptídeos - MHC. As proteínas CD3 transmitem

então, sinais que iniciam o processo de ativação das células T. Atuando ainda na reação, como co-receptor está a molécula CD4, quando a interação do linfócito T for com a molécula do MHC de classe II, ou CD8, se for de classe I ³¹.

O mecanismo pelo qual o MHC atua no desenvolvimento do diabetes tipo 1 não está completamente elucidado, porém o grande polimorfismo das moléculas de classe II no sítio de ligação peptídica tem sido a base desta associação, conferindo susceptibilidade ou resistência para a doença.

Entre os alelos que codificam as moléculas de classe II no *locus* HLA-DR, DR*03 ou DR*04 são os mais freqüentes nos pacientes diabéticos (95% *versus* 50% dos controles caucasianos). Considerando que 30% a 40% destes pacientes são heterozigotos -DR*03/DR*04 (*versus* 2-3% dos controles), este genótipo confere o maior risco para a progressão da doença, seguido pela homozigose para -DR*04 e, finalmente, para -DR*03 ^{12,48}.

Os alelos DRB1*0405 e *0401 são de predisposição, os *0402 e *0404 são neutros e os *0403, *0406 e *0407 são protetores ¹².

Há diferenças étnicas nesta predisposição genética. Assim, o efeito sinérgico -DR*03/DR*04, evidenciado em caucasianos, não é observado na população japonesa, na qual os alelos -DR*04, -DR*08 e -DR*09 conferem maior susceptibilidade para a doença ^{32,34,35}. Já o alelo DRB1*03 ³⁶, parece ser o de maior susceptibilidade na população asiática (exceto para os japoneses). Por outro lado, os alelos -DRB1*15 e -DRB1*11 são considerados protetores para diabetes na maioria dos grupos étnicos ^{12,48}.

Quanto ao *locus* HLA-DQ, este codifica um heterodímero funcional altamente polimórfico, constituído de duas cadeias glicoproteicas α e β sendo dois *loci* expressos (DQA1 e DQB1) e dois pseudogenes (DQA2 e DQB2). O *locus* -DQB1 possui 42 alelos atualmente reconhecidos, divididos em 5 subgrupos DQB1*02, *03, *04, *05 e *06, com o seguinte número de alelos em cada grupo: 03, 11, 02, 05 e 21, respectivamente ^{37,38}.

Em caucasianos, os alelos -DQA1*0301, -DQB1*0302 e -DQA1*0501, -DQB1*0201 estão fortemente associados com diabetes e encontram - se em

desequilíbrio de ligação com os alelos HLA-DR*04 e DR*03, respectivamente³⁹. A susceptibilidade ao diabetes está mais relacionada ao haplótipo DQA1-DQB1 que aos alelos isolados. Nas populações caucasianas os haplótipos que conferem maior risco são HLA-DQA1*0501-DQB1*0201 e DQA1*0301-DQB1*0302^{40,36}.

Outro fator a considerar é a complementaridade entre as cadeias DQ α e DQ β em *cis* ou *trans*, que também influencia o risco para o desenvolvimento do diabetes: a associação DQA1*0501-DQB1*0302, formada pelos genes na posição *trans*, apresenta maior susceptibilidade para a doença^{40,41}.

A proteção para o diabetes é conferida principalmente pelo alelo -DQB1*0602^{42,43,44}.

Há poucos estudos analisando os principais genes envolvidos com DM tipo 1 no Brasil, população com marcante miscigenação étnica. Em 2005, no projeto realizado no HC-FMUSP com diabéticos tipo 1A, atendidos no ambulatório do Hospital das Clínicas em São Paulo. Davini et al²⁸, evidenciaram os seguintes haplótipos como determinantes dos maiores riscos relativos(RR) para diabetes: HLA-DRB1*03/ DQB1*0201 em 45,2% (RR 2,6) e -DRB1*04/ DQB1*0302 em 52,7% (RR 2,9) dos diabéticos versus 17,8% e 16,3% dos controles, respectivamente. Já os haplótipos -DRB1*11/DQB1*0301, -DRB1*13/DQB1*0602, -DRB1*13/DQB1*0603 e -DRB1*15/DQB1*0602 (RR 0,14) conferiram proteção, à semelhança das populações caucasianas. Os maiores riscos relativos foram conferidos pelos genótipos -DR3/DR4 em 23,6% (RR 6,7) e -DQB1*0201/*0302 em 20,9% dos pacientes (RR 18,4) versus 3,3% e 1,1% dos controles respectivamente²⁸. Alves e cols⁴⁵ analisaram cinco outros estudos sobre alelos e haplótipos HLA no Brasil, confirmando a maior susceptibilidade para os haplótipos DR3/DQ2 e DR4/DQ8 e para os alelos HLA classe I -A2, -B8, -B13 e -B15; e a proteção, para alelos - DQB1*0602 e - DQB1*0301, DR2 e DR7.

Os genes do Sistema HLA favorecem também, outras doenças endócrinas autoimunes, que afetam cerca de 5-10% da população, e incluem

a doença de Addison, a doença de Graves, a tireoidite de Hashimoto, a insuficiência ovariana prematura e a síndrome poliglandular autoimune⁴⁶.

7. Região do VNTR do Gene da Insulina (*Variable number in tandem repeats*)

O segundo maior locus de susceptibilidade para o DM tipo 1, denominado IDDM-2,⁴⁷ situa-se na região 5' do gene da insulina (INS), no cromossomo 11p15. A maior associação com DM1 foi definida para a região minisatélite não transcrita, altamente polimórfica: VNTR – números variáveis de repetições consecutivas, composta de 14 a 15 pares de base de oligonucleotídeos ricos em G+C, (seqüência consenso: ACAGGGGTGTGGGG)⁴⁷. Compreende três classes de alelos de acordo com o seu tamanho, determinado pelo número de unidades repetidas^{12,14, 47, 48}.

Undlien et al.⁴⁹, demonstraram que os alelos de classe I (26-63 unidades repetidas) conferiam susceptibilidade ao diabetes tipo 1 na população caucasiana, o que não foi observado nos negros e japoneses. A presença dos alelos de classe I varia de 30-61% nos controles normais, enquanto que na população diabética caucasiana é geralmente superior a 60%, conferindo risco relativo de 1,9 a 3,5^{47,50}. Os alelos de classe III (141-200 unidades repetidas) são predominantemente protetores e estão associados com redução de 60-70% no risco de desenvolver DM tipo 1, mesmo na presença de autoanticorpos e de genótipos HLA de risco^{51,52,53}. Os alelos de classe II são encontrados predominantemente nas populações negras, são raros em caucasianos e existem poucos dados sobre esta classe de alelos^{54,55}.

Em estudo realizado no HC- FMUSP por Davini et al²⁸, a prevalência para o genótipo INS VNTR I/I foi de 60,4% nos pacientes diabéticos e de 27,2% na população controle, conferindo risco relativo para DM1A de 2,2%.

Os alelos de classe III, condicionam, no timo, níveis mais elevados de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) de insulina (2 a 3 vezes), e da proteína pré-pró-insulina, a qual é um antígeno chave na patogênese do

diabetes tipo 1. A maior transcrição tímica de insulina modulada pelos alelos de classe III poderia contribuir para a melhor tolerância imune nos indivíduos portadores destes alelos por aumentar a probabilidade de seleção negativa das células T tímicas autoreativas ^{54,56,57}.

O polimorfismo do INS-VNTR não parece determinar susceptibilidade para outras doenças autoimunes ^{12,58}.

8. Gene CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen-4*)

Outra região relacionada ao DM1A está localizada no cromossomo 2q33 e contém os genes das moléculas CTLA-4, CD28 e ICOS, em desequilíbrio de ligação. ^{12,14,32}.

O antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) é uma molécula de superfície celular da superfamília das imunoglobulinas. Expressa-se em linfócitos T CD4+ e CD8+ ativados e liga-se às moléculas B7-1 e B7-2 das células apresentadoras de antígenos (APCs), inibindo a ativação das células B e T, a proliferação das células T, a produção de citocinas e de imunoglobulinas ^{12,14,32}.

Inúmeros polimorfismos do gene CTLA-4 têm sido associados ao DM1A, mas com resultados conflitantes. Entre eles, está o microssatélite (AT) n 3'UTR (região não transcrita), o polimorfismo A/G na posição 49 do exon 1 (A49G); o polimorfismo C/T na posição 318 da região promotora, entre outros.

O polimorfismo A49G também foi associado a outras doenças autoimunes como o hipotireoidismo, a doença celíaca, a artrite reumatóide, a miastenia de gravis, a esclerose múltipla e a doença de Addison ^{59,60,61}.

Em São Paulo, estudos de Gamberini et al ⁶² e Hauache et al. ⁶³, não verificaram a associação dos polimorfismos: A49G e -318C/T, no Exon 1 e região promotora respectivamente, com diabetes autoimune.

9. Gene PTPN-22 (*Protein Tyrosine Phosphatasis, non receptor 22*)

O gene PTPN-22, localizado no cromossomo 1p13, codifica a proteína tirosina fosfatase, que é expressa primariamente nos tecidos linfóides, também chamada *Lymphoid Tyrosine phosphatase* (Lyp). Lyp é uma proteína intracelular que interage com a quinase reguladora negativa (Csk), formando um complexo que inibe a ativação de células T⁶⁴.

Estudos funcionais indicam que a ligação à Csk está alterada na variante C1858T, favorecendo a ativação imune^{12,14,32}. Alternativamente, a variante Lyp pode afetar a população de células T reguladoras, tornando-as menos efetivas na supressão da resposta imune³². Esse polimorfismo confere susceptibilidade ao DM1 em várias populações^{12,48,66}. Seu efeito parece ser independente do HLA ou do genótipo de risco VNTR I/I do gene da insulina, estando ainda relacionado à presença persistente do anticorpo anti-GAD65 em pacientes com duração do diabetes superior a 10 anos⁶⁵.

Confere ainda susceptibilidade a outras doenças autoimunes, órgãos específicas e sistêmicas como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, tireoidite de Hashimoto e doença de Graves^{12,66}.

Estudo em São Paulo (FMUSP) encontrou associação entre o polimorfismo R620W e DM1. Os genótipos TT e CT, presentes em 17,9% dos indivíduos com DM1 e 9,5% dos controles, foram associados ao aumento do risco de desenvolver DM1A (OR = 2.069) enquanto o genótipo C/C foi protetor (OR = 0,5)⁶⁷.

10. Mecanismos da Tolerância Imunológica

Frente a estímulos antigênicos, a diferenciação dos linfócitos T era classicamente considerada como dirigida para os subtipos T helper 1 (T_H1) e T_H2 ⁶⁸, na dependência de influência de citocinas, tipos de antígenos, fatores de transcrição, vias de sinalização e fatores genéticos. Os patógenos intracelulares, ao promoverem a produção de interleucina-12 (IL-12) pelas células apresentadoras de antígenos, induzem o desenvolvimento de células T_H1 , produtoras de IFN- γ e linfotóxica fator citotóxico (CFL). O IFN- γ produzido, por sua vez, auxilia e perpetua a diferenciação T_H1 , associada à resposta imune mediada por células contra patógenos e à indução de doenças autoimunes, órgão - específicas. Paralelamente inibe a via T_H2 ^{31,69}.

Já os patógenos helmintos promovem a geração de células T_H2 , produtoras de IL-4, a qual direciona a diferenciação T_H2 e a expressão das interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, além de antagonizar a produção de IFN- γ . A via T_H2 está associada às doenças alérgicas e atópicas e à inibição de doenças autoimunes. Assim as células T_H produzem citocinas que promovem a sua própria diferenciação e antagonizam a de outras linhagens.

A dicotomia simplista T_H1 e T_H2 da resposta imune foi confrontada com a descoberta recente de nova linhagem de células T, as células T_H17 , caracterizadas pela secreção da citocina pró-inflamatória IL-17, implicada na proteção contra bactérias extracelulares e na gênese de doenças autoimunes. A IL-17 é potente citocina inflamatória e de destruição celular. Induz a expressão de mediadores inflamatórios inatos, incluindo IL-6, proteínas de fase aguda, fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF) e prostaglandina E2. Mobiliza, recruta e ativa neutrófilos, expandindo o pool destas células⁷⁰.

A diferenciação T_H17 a partir de células T CD4+ virgens depende do estímulo de IL-6, IL-1 e TGF β (fator transformador de crescimento beta), produzidos por células dendríticas ativadas por patógenos. IL-6 e IL-23 ativam STAT3 (fator transdutor e ativador da transcrição tipo 3), induzindo a

expressão do receptor retinóide órfão ROR γ t, crítico para a diferenciação T_H17. As células T_H17 por sua vez produzem, via STAT 3, a IL-21 que funciona como regulador autócrino da produção de IL-17, induzindo a expressão de ROR γ t, IL-17 A e IL-17F. Assim, a IL-21 promove e mantém a linhagem T_H17^{68,71}. Outra citocina da família IL-12 com efeitos pró-inflamatórios, a IL-23, produzida por macrófagos e células dendríticas, também participa na diferenciação e manutenção das células T_H17 (Fig 2).

Paralelamente à ativação da via T_H17, há inibição da diferenciação das células T regulatórias - Treg. As células T regulatórias são as células T CD4⁺ que expressam grande quantidade da molécula CD25 (cadeia alfa do receptor da IL-2) na sua superfície (células T CD4⁺ CD25^{high})^{73,74} e sua ativação depende da presença de TGF- β ⁷².

O controle da magnitude e duração da resposta imune é parcialmente exercido pelas células T regulatórias, responsáveis pela imunossupressão e proteção contra doenças autoimunes.

Figura 2: Diferentes linhagens de células T helper em camundongos. Percussores de célula T helper (Thp) podem ser direcionados mutuamente para fenótipos T_H1, T_H2, T_H17 e células T regulatórias (Treg) com base no envolvimento de citocinas. Presença de interleucina (IL-12) promove direcionamento para T_H1, via transdutor de sinal e ativador de transcrição

(STAT-4). Células T_H1 são caracterizadas pela expressão de T-bet e produção de interferon- γ e fator de necrose tumoral- α . Células T_H2 são promovidas pela IL-4 via sinalização de STAT-6 e caracterizadas pela expressão de GATA-3. Desenvolvimento dos fenótipos Treg e T_H17 requerem a presença de fator transformador de crescimento β . Este, na presença preferencial de IL-6 direciona para o fenótipo T_H17 . Já células Treg expressam *Foxp3* e são estimuladas por TGF- β ⁷⁵.

As células T_H17 e as IL-17A e IL-23 estão envolvidas em doenças autoimunes em humanos e animais, tais como artrite reumatóide, lúpus erimatoso sistêmico (LES), psoríase, doenças inflamatórias intestinais e encefalomielite experimental autoimune (EAE), e nas respostas imunes alérgicas específicas como nas doenças respiratórias⁷⁶. A IL-17A é atualmente, considerada a principal efetora de inflamação induzida por células T $CD4^+$ na artrite induzida por colágeno (CIA) e na EAE em roedores. O uso de anticorpos neutralizadores de IL-17A atenua a progressão da autoimunidade. De fato, os níveis de IL-17A estão elevados no sangue e na sinóvia na artrite reumatóide (RA) e o seu bloqueio na CIA reduz a doença. Superexpressão de IL-17A causa artrite em roedores, enquanto ratos *knockout* para IL-17^{KO} ou ICOS^{KO} (que não conseguem produzir IL-17A) são resistentes à CIA⁷⁷.

O papel da via T_H17 no desenvolvimento do DM1A foi também sugerido em camundongos. A injeção de IL-23 e streptozotocina causa diabetes associado à apoptose de células β e à expressão de TNF- α , IL-18, INF- γ e IL-17A, sendo a concentração de IL-17A relacionada ao grau de lesão das células β ⁷⁸. Injeções apenas de streptozotocina também elevam os níveis circulantes de IL-17A⁷⁹. Camundongos NOD têm aumento de transcritos de genes que codificam citocinas inflamatórias, como a IL-17A⁷⁶.

Com base nestes dados, seria importante o conhecimento da atuação das vias reguladoras da via T_H17 na autoimunidade.

Estudos em nosso laboratório evidenciaram diminuição da expressão de receptores da IL-17 e da IL-21 em linfócitos T periféricos CD3 e CD4 de pacientes com DM1A de início recente^{80,81}.

Sabe-se que outra citocina, a IL-27, inibe a produção da IL-17 nas fases iniciais da ativação das células T CD4⁺ e poderia desempenhar um papel importante na gênese do diabetes.

No presente trabalho foi estudado o gene da *IL-27p28*, com o intuito de avaliarmos seu papel na regulação da via T_H17 no diabetes autoimune.

11. Ações da Interleucina 27

A IL-27, citocina heterodimérica da família da IL-12, está envolvida na patogênese do diabetes autoimune em murinos^{82,83}. É composta pelas subunidades p28 (um peptídeo de 28 KDa, análogo à subunidade p35 da IL-12) e EBI3 (proteína do gene 3 induzida pelo vírus *Epstein Barr*, um polipeptídeo de 33kDa, estruturalmente homólogo à subunidade p40 da IL-12). É expressa, predominantemente em macrófagos ou células dendríticas derivadas de macrófagos e em células endoteliais.

O receptor da IL-27 é um heterodímero composto pelas subunidades: IL 27R (também chamada WSX-1, IL-27R α ou TCCR - Receptor de Citocina da Célula T) e gp130. WSX-1 é um receptor de citocina classe I, com homologia ao receptor da IL-12, expresso em células T CD4⁺, células NK/NKT, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, mastócitos e células endoteliais, sugerindo efeitos pleiotrópicos da IL-27. Esta subunidade confere especificidade de ligação para a IL-27(Figura 3)

Stanislas Goriely, Markus F. Neurath and Michel Goldman Janeiro 2008- Nature publishing group.

Figura 3: Família da IL-12, formada pelas interleucinas IL-12, IL-23 e IL-27, apresentando suas subunidades e seus receptores(R).

STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição; **IFN-γ:** Interferon gama.

Após a ligação da IL-27 com o receptor, várias vias são ativadas através dos reguladores de transcrição STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 e T-bet, e esta diversidade de ações está implicada nas funções antagônicas, muitas vezes conflitantes, da IL-27 na resposta imune, a saber:

- 1) Iniciadora das reações T_H1 , via indução de STAT1 e T-bet. A IL-27 estimula a proliferação clonal de células T $CD4^+$ virgens e tem efeito potente, sinérgico com a IL-12, na produção de IFN- γ pelas células T $CD4^+$ ⁸⁴, atuando na defesa contra infecções. Camundongos deficientes da subunidade WSX-1 do receptor da IL-27 têm maior susceptibilidade a infecções por patógenos intra-celulares como *Leishmania major* e *Listeria monocytogenes*^{105,106}.
- 2) Atenuadora da produção de citocinas inflamatórias como a IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-17. Via STAT1, também suprime o desenvolvimento de células inflamatórias T_H17 .

Há vários estudos evidenciando a participação da IL-27p28 nas doenças autoimunes.

É altamente expressa na doença inflamatória intestinal e encefalite experimental autoimune^{85,86,110,111}.

Wang. E. et al. investigaram o papel potencial da IL-27 no diabetes autoimune e detectaram valores elevados de IL-27 no sangue e em sobrenadante de cultura de células dendríticas de camundongos NOD diabéticos⁸³. O bloqueio da IL-27 com anticorpo anti-IL-27 retardou o aparecimento do diabetes transferido por esplenócitos, enquanto os esplenócitos de animais diabéticos tratados com a IL-27 promoviam o aparecimento da doença, quando comparados com os controles não tratados. Além disso, a IL-27 regulou positivamente a produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN γ e a IL-17 e, negativamente, as citocinas anti-inflamatórias, IL-4, TGF- β e IL-10, secretadas por esplenócitos dos animais diabéticos. Estes resultados evidenciaram um papel da IL-27 nas células T que medeiam o diabetes autoimune em camundongos NOD⁸³. Os níveis de IL-17 eram elevados, mas não foi evidenciado papel estimulador da IL-27 na produção de IL-17 pelas células T_H17, mas por células T $\gamma\delta$. A IL-27, além de suprimir a diferenciação das células T_H2, também suprimiu a diferenciação de células T reguladoras CD4⁺ FOXP3, por interferir com a produção de TGF- β .

Por outro lado, outros pesquisadores mostraram efeito atenuador (ou supressor) da IL-27 nas respostas inflamatórias, via STAT 1 e STAT3⁸⁵. Através destas vias, a IL-27 inibiu a produção de várias citocinas pró-inflamatórias IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-17- *in vitro* pelas células T CD4⁺ ativadas (e também a sua proliferação).

Desta forma, a IL-27 foi capaz de limitar a intensidade e a duração da ativação das células T e suprimiu o desenvolvimento de células T_H17 induzidas por IL-6 e TGF- β ^{87,88,89}.

O papel imunossupressor da IL-27 é particularmente importante na prevenção da inflamação excessiva, que pode resultar em graves lesões teciduais e autoimunidade. Deficiência do receptor de IL-27R α confere

susceptibilidade a doenças autoimunes e gera mais células T_H17 em camundongos^{105,106}.

O aumento da expressão da IL-27 e de seu receptor foi associado a condições inflamatórias crônicas como a sarcoidose e a doença de Crohn. Inicialmente ficou difícil afirmar se isto indicaria uma função pró-inflamatória para IL-27 ou apontaria para um mecanismo regulatório endógeno, capaz de limitar a atividade das células T e a inflamação⁹⁰. O esclarecimento veio com Fitzgerald DC et al.⁹¹ que observaram o papel supressor da IL-27 na encefalomielite experimental autoimune em camundongos, onde ela se correlacionava com o curso da doença. Nestes animais, havia máxima expressão da IL-27 e seu receptor WSX-1 no sistema nervoso central na fase de pico da doença, declinando durante a remissão e aumentando novamente nas recorrências. Os autores sugeriram que a IL-27 regulava negativamente a inflamação, particularmente a induzida por células T_H17 , podendo representar uma resposta supressiva do hospedeiro ao ataque imune.

A IL-27 também parece limitar a inflamação causada pela IL-17 na uveíte e esclerite^{92,93,94}, sugerindo a possibilidade de abordagem terapêutica para esta interleucina, capaz de atuar nas fases iniciais das doenças autoimunes.

Os mecanismos pelos quais a IL-27 exerce funções regulatórias foram também estudados por Ouaked N et al.⁹⁶, em linfócitos periféricos de indivíduos saudáveis, evidenciando a abrangente capacidade da IL-27 de agir sobre as células *naïve* T $CD4^+$ durante a sua diferenciação em células efetoras.

Quando a estimulação da IL-27 está associada à do TGF- β , as células sofrem diferenciação para Treg induzidas, com redução da produção de IFN- γ e potencial capacidade supressiva. Após o estímulo de IL-27, a fosforilação de STAT1 o capacita a se ligar ao promotor do FOXP3, aumentando a expressão deste gene através da regulação epigenética do receptor.

A expressão de FOXP3 foi também impulsionada pela co-estimulação do IFN- γ com TGF- β , por mecanismo similar, envolvendo a ativação e a ligação da molécula STAT1 em elementos específicos na porção proximal do promotor FOXP3 e a modulação de acetilação das histonas desta região.

Estes efeitos da IL-27 no homem diferem dos observados em animais, o que trouxe discordância na literatura e dificultou a compreensão das ações da IL-27. Em murinos, a IL-27 inibe a indução do FOXP3 pelo TGF- β e a diferenciação das células Treg induzidas^{98,99}, evidenciando uma clara função espécie-específica para a IL-27¹⁰⁰. Macrófagos de murinos mostraram-se minimamente responsivos à IL-27, enquanto monócitos humanos são fortemente ativados pela IL-27 principalmente via STAT1¹⁰⁰.

A sinalização da IL-27 também resulta na ativação de STAT5, importante no desenvolvimento e manutenção das células Treg induzidas. Desta forma, a IL-27 exerce um papel fundamental na regulação do gene *Foxp3* por interagir com inúmeras seqüências reguladoras⁹⁶.

Paralelamente, a IL-27 desempenha função crítica na diferenciação T_H2 , quando prevalecem os seus efeitos inibitórios¹¹². A sinalização da via IL-27/WSX-1 reduz a hiper-reatividade de vias aéreas e a inflamação pulmonar durante o desenvolvimento da asma alérgica, relacionada à resposta T_H2 ¹¹³. A IL-27 ainda induz a citocina anti-inflamatória IL-10 via STAT1 e STAT3 (Stumhofer 2007), ampliando seu efeito imunomodulador.

A IL-27 ativa o fator de transcrição c-Maf, regulador da transcrição da IL-21 estimulando a produção de IL-21 e a expressão do seu receptor em linfócitos T e B¹¹⁴. A IL-21 age como fator de diferenciação e crescimento autócrino para as células T regulatórias 1.

Larousserie F et al.⁸⁸ observaram que a IL-27 também participa da diferenciação e ativação de linfócitos B virgens, mas não nos de memória. Tem, ainda, efeito antitumoral.

Assim, a IL-27 tem papel crucial no desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T e B e desempenha ações importantes na defesa contra infecções e doenças autoimunes. A IL-27 parece atuar como antagonista da

inflamação mediada por células T, como reguladora de respostas T_H2 , como inibidora do desenvolvimento de células T_H17 e da proliferação das células T^{97} , coordenando os subtipos celulares T_H , e refinando a resposta imune.

Esta diversidade de efeitos habilita o gene da *IL-27p28* como candidato potencial para a autoimunidade. Sabe-se que a diferenciação dos linfócitos T depende de múltiplas influências ambientais e do ambiente de citocinas, tipos de antígenos, fatores de transcrição e múltiplas vias de sinalização. Porém, polimorfismos no gene da *IL-27p28* podem ser fatores críticos predisponentes ao desbalanço entre as linhagens celulares e à autoimunidade. Paralelamente, alterando a defesa contra patógenos, permitiriam o estabelecimento de infecções persistentes, incluindo aquelas por vírus, que podem precipitar reações autoimunes.

Estudos em populações asiáticas implicaram o polimorfismo g.-964A>G no gene da *IL27p28*, na susceptibilidade à asma e a processos alérgicos, dependentes da ativação de linfócitos T_H2^{69} , e à doença pulmonar obstrutiva crônica, associada à menor resposta da IL-27¹⁰⁷. Esta variante também confere susceptibilidade para a colite ulcerativa, a doença de Crohn¹¹⁵, mas na infecção crônica pelo vírus da hepatite B, não houve correlação deste polimorfismo com a doença¹¹⁶. Inclusive, os níveis de IL-27 estavam elevados na última doença.

Resultados do *genome-wide association studies* (GWAS) sugeriram a IL-27, como gene candidato à predisposição ao DM1A em caucasianos¹¹⁷.

Trabalho recente realizado em nosso laboratório demonstrou diminuição significativa da expressão dos receptores da IL-21 e da IL-17 em linfócitos T $CD3^+$ e $CD4^+$ e de células T reg em sangue periférico de pacientes com DM1A de início recente^{80,81}. Não está definido se esta diminuição decorre de mecanismos intrínsecos à expressão dos receptores ou de fenômeno de *down regulation* dos receptores, frente a níveis elevados destas citocinas.

A IL-27, atuando na regulação das células T_H17 , e Treg e na expressão do receptor da IL-21, poderia ter participação no processo inflamatório do diabetes autoimune.

Optamos, então, por estudar a interleucina 27-subunidade p28, investigando a presença de mutações e/ou polimorfismos no seu gene que pudessem estar associados à predisposição ao diabetes *mellitus* tipo 1 autoimune.

Embora seu papel na autoimunidade não esteja definido, se confirmado seu efeito supressor na inflamação e na regulação das vias T_H1 e T_H17 , a IL-27 poderá ser útil na terapia destas doenças. Não há estudos avaliando seu efeito na susceptibilidade do diabetes autoimune do homem e nas suas manifestações clínicas.

12. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Os mecanismos moleculares e as citocinas que determinam o diabetes autoimune não estão totalmente elucidados.

O desequilíbrio da diferenciação das células T_H1 e Tregs, a partir das células $T\ CD4^+$, direcionada por autoantígenos, tem forte implicação no diabetes em murinos¹⁰². Paralelamente, as interleucinas IL-17 e IL-21, da via T_H17 , têm participação em várias doenças autoimunes, incluindo o diabetes autoimune em animais e têm, como principal produção a IL-17 A, citocina altamente inflamatória.

A IL-27, atuando na regulação da via T_H17 , poderia participar do processo inflamatório do diabetes autoimune. Alterações no gene da *IL-27p28*, interferindo na sua expressão, poderiam favorecer a inflamação mediada pela IL-17 e atenuar a função supressora das células T reguladoras. Redução de sua ação poderia, inclusive, estar relacionada à diminuição da expressão dos receptores da IL-21 em linfócitos de pacientes com DM1A de início recente.

Investigamos assim, a presença de mutações e/ou polimorfismos no gene da *IL- 27p28* que pudessem interferir com a sua ação e na predisposição ao diabetes tipo 1 no homem.

OBJETIVOS DO ESTUDO

Nosso estudo teve como objetivos:

Avaliar o papel do gene da *IL-27p28* na patogênese do DM1A, através da análise da região 5' proximal e regiões codificadoras do gene da *IL-27p28*, em pacientes DM1A e controles normais, buscando identificar:

- ✓ Polimorfismos ou mutações determinantes de susceptibilidade ao DM1A.
- ✓ Associações das variantes encontradas com manifestações clínicas do diabetes e produção de autoanticorpos.

MÉTODOS

DNA genômico foi obtido à partir de 15 mL de sangue periférico, colhidos com 25 mM de ácido etileno diaminotetracético (EDTA). A técnica utilizada foi a de extração pelo método de “*salting-out*” (Miller et al., 1988). O DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro *Ultrospec III* (Amersham Pharmacia Biotech). Após a etapa da quantificação, as amostras foram diluídas, para uma faixa de concentração final de 100ng/μL, para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Estas amostras de DNA genômico fazem parte do Banco de DNA do Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios - LIM 18 e Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular – LIM 25.

1. Considerações Éticas

Foram analisados pacientes portadores de diabetes tipo 1 A, recrutados nos Ambulatórios de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ou mediante encaminhamento de profissionais interessados no estudo. Todos receberam esclarecimentos quanto à pesquisa, assinando previamente o termo de consentimento pós-informação, seguindo as orientações contidas na Declaração de Helsinki. (anexo 2) Este projeto foi submetido, à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e aprovado como Protocolo de Pesquisa nº 0233/08. (anexo 1)

2. Casuística

2.1. Pacientes

A Avaliação do gene da *IL-27p28* foi realizada a partir do material genético do Banco de DNA de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1 A (Protocolo de Pesquisa CAPPesq nº 1169/05.) pertencente aos Laboratórios de Investigação Médica- Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios- LIM 18 e Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular – LIM 25.da Faculdade de Medicina da USP .

As coletas de sangue para a avaliação dos marcadores imunológicos e genéticos, bem como as dosagens de glicemia, hemoglobina glicada e peptídeo C e foram feitas após assinatura de termo de consentimento pós-informação. (ANEXO 2)

Foram incluídos neste estudo, 318 pacientes (129 homens e 189 mulheres) portadores de Diabetes *Mellitus* tipo 1 A.

Os pacientes foram selecionados pelos critérios clínicos por apresentarem:

- ✓ Hiperglicemia grave ou cetoacidose
- ✓ Início precoce de insulinoterapia
- ✓ Presença de um ou mais autoanticorpos pancreáticos positivos e/ou alelos HLA de risco para DM1A

Os critérios de exclusão foram:

- ✓ diabetes de causa não autoimune
- ✓ irmãos biológicos

2.2. Controle

O Grupo Controle constou de 296 indivíduos saudáveis (131 homens e 165 mulheres), apresentando as seguintes características:

- ✓ ausência de história familiar de Diabetes *Mellitus* tipo 1 A ou qualquer doença autoimune.
- ✓ glicemia de jejum e hemoglobina glicada normais.

3. Estudo Molecular

3.1. Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para amplificação da região 5' proximal do gene da *IL-27p28* e da região codificadora do gene, composta por 5 exons e suas regiões flangeadoras (figura 4). As sequências dos iniciadores utilizados, temperatura de “*annealing*” e tamanho do fragmento amplificado estão descritos na tabela 1A .

A seqüência referência do gene número ENSG00000197272 utilizada foi obtida no Banco de Dados *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>)

www.ensembl.org

figura 4: Ilustração do cromossomo 16, com a localização do gene da *IL-27p28* e abaixo, figura representativa dos 5 exons do gene da *IL-27p28* <http://www.ensembl.org/index.html>

Tabela 1: Oligonucleotídeos selecionados para a amplificação do gene da *IL-27p28*.

Regiões	Iniciador Sense	Iniciador Antisense	T °C	Fragmento (pb)
Região 5' proximal	5'CATGGCCTCTACAGAGCAGA3'	5'GCTTGTGGCCTATAGGGTT3'	60	221
Região 5' proximal	5'GCCTCGGACCTGGTTTTAT3'	5'TCTTATACTGGGGGCTGTGC3'	61	571
Exon 1	5'GGCGAGAGGGAAGAATGAGT3'	5'AGACCTTTGACCCAGTGAGG3'	61	594
Exon 2-3	5'GTGGTTTTGAGGAGGCAGAG3'	5'TCTATCCCCAATGCATCTCC3'	61	596
Exon 4	5'GTGGGGGAAGAGCTACAGG3'	5'AGACCCACATGCACTCAGAG3'	59	584
Exon 5	5'AGGATTCCTCTCAGGTTCTCG3'	5'AGCCCTTACCCGAAGAGAAG3'	59	650

Para cada reação foi utilizado um volume final de 25 µL contendo: 100 ng/µL de DNA genômico, 10mM de cada dNTP, 10pmol dos oligonucleotídeos iniciadores, 5U/µL da enzima *Taq Platinum* DNA polimerase, tampão de reação 10X e MgCl₂ 50mM (*Invitrogen™ Life Technologies*, Brasil). A amplificação foi realizada em termociclador Veriti 96 well (*Applied Biosystems-Life Technologies, Foster City, CA, USA*). O protocolo de amplificação consistiu de um ciclo de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, temperatura de “*annealing*” (59 – 61°C) de acordo com os iniciadores, por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; ciclo de extensão a 72°C por 10 minutos, finalizando a 15°C. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo 10mg/mL (*Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) utilizando, como marcador de peso molecular, o *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, USA*). Os fragmentos foram visualizados e analisados sob transiluminação em luz ultravioleta (Eletronic U.V.Transiluminator – Ultra Lum) e fotodocumentador (Vilber Loumart). (Figura 5)

Figura 5: Foto do Gel de Agarose a 2%, demonstrando o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase do gene da *IL-27p28*.

3.2. Sequenciamento automático

Apenas os produtos amplificados foram utilizados no sequenciamento, obedecendo critérios de fragmento de banda única e concentrações $\leq 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$, que foram estimadas através da comparação com fragmentos do marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™ Life Technologies, Brasil) em gel de agarose 2%, contendo brometo de *etídeo*. Posteriormente, 5 μL do produto de amplificação foi submetido à purificação enzimática com a adição de 2 μL da ExoSAP-IT - combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I (*USB Corporation – GE Healthcare*). A reação foi processada a 37°C por 15 minutos, seguido por mais 15 minutos a 80°C. Os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento. O protocolo consistiu na adição de: 1,5 μL de “*Big Dye*” (*ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits - Applied Biosystems-Life Technologies*), 0,5 μL do iniciador a 10pMol (*Forward* ou *Reverse*) juntamente com 6,0 μL do Tampão “*Save Money*” (*Applied Biosystems Life Technologies*), obedecendo ao seguinte programa de ciclagem: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4

minutos, num total de 25 ciclos, finalizando a 15°C. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems - Life Technologies*). Estes produtos foram submetidos à precipitação com EDTA (125mM), Acetato de Na(3M) e Ethanol PA (Merck Reagentes), de acordo com as recomendações da *Applied Biosystems- Life Technologies*.

Os produtos de sequenciamento foram então submetidos à eletroforese capilar e analisados em sequenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer XI 3130 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems/Hitachi)*. Os cromatogramas foram comparados com sequências depositadas em Banco de Dados (www.ensembl.org-Ensemble Genome Browser) e lidos nos programas *Chromas Lite 2* e *Sequencher 4.8*.

3.2. PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Para a identificação do polimorfismo -964 A>G (rs153109), 10µL do produto amplificado foi acrescido de 2 µL de Tampão NEB4 (10X), 0,2 µL Enzima *Taq I* (4U) , 0,2 µL BSA (10mg/mL) (New England – *Biolabs* Uniscience-EUA), num volume final de 20 µL, com H₂O Milli-Q estéril.

A digestão foi processada a 37°C por 120 minutos e inativada a 65°C por 20 minutos, finalizando em 10°C. Todas estas etapas foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems - Life Technologies*). O produto digerido foi visualizado em gel de agarose 2,5%, contendo *brometo de etídeo*, sob transiluminação em luz ultravioleta (Eletronic U.V.Transiluminator – Ultra Lum) e fotodocumentador (Vilber Loumart) .

O sítio de reconhecimento da enzima *Taq I*, consiste da sequencia:

Desta forma, o produto com 221 pares de base, não digerido por esta enzima, representa o genótipo AA. A presença do alelo G em homozigose produz um sítio de reconhecimento que gera dois fragmentos, um de 150 e outro de 71 pares de bases. O genótipo AG é representado por três fragmentos de 221, 150 e 71 pares de base (figura 6)

Para a confirmação do método, foi realizado o sequenciamento automático de algumas amostras, utilizadas como controles positivo e negativo, validando a metodologia PCR-RFLP.

Figura 6: Foto do Gel de Agarose a 2,5%, demonstrando o tamanho dos fragmentos do gene da *IL-27p28* obtidos após a digestão pela enzima *Taq 1* no ensaio de restrição (Reação em Cadeia da Polimerase- Restriction Fragments Length Polymorphism)

3.4. Genotipagem dos alelos HLA-DR

A amplificação dos alelos HLA-DRB1 e DQB1 foi realizada pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) alelo específica (PCR SSP - *Sequence Specific Primers*) utilizando o conjunto diagnóstico de tipagem para DRB1 genérico e DQB1 subtipagem (Micro SSP™ *Allele Generic and Specific* HLA classe II DNA Typing Tray-One-Lambda INC). O

conjunto para análise dos alelos DRB1 é constituído por 23 diferentes oligonucleotídeos iniciadores de seqüências específicas e do gene da β -globina humano utilizado como controle negativo. O conjunto para análise dos alelos DQB1 é constituído por 31 diferentes oligonucleotídeos iniciadores de seqüências específicas e do gene da β -globina humano. Acrescentou-se aos tubos contendo os iniciadores: mistura de oligonucleotídeos, alíquotas de DNA (100 ng/ μ L) e a enzima *Taq*-DNA-polimerase 5 U/ μ L (2,5 μ L para DRB1 e 3,5 μ L para DQB1). A seguir foram submetidos à amplificação com ciclos pré-definidos pelo fabricante em termociclador MJ, com o seguinte programa de ciclagem: **1**- 96°C – 2 minutos e 10 segundos, **2** - 61°C - 1 minuto, **3** - 96°C-10 segundos, **4** – 61°C -1 minuto, **5** – repetição das etapas 3 e 4 – 8 vezes, **6** - 96°C -10 segundos, **7** - 57°C - 50 segundos, **8** - 72°C - 30 segundos, **9** – repetição das etapas 6 a 8 ,19 vezes, finalizando em 15°C. As amostras de DNA amplificadas foram transferidas e submetidas à eletroforese em gel de agarose (2,5%), coradas com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas após exposição à luz ultravioleta por sistema de fotografia e posteriormente analisadas em computador, através de programa específico fornecido pelo fabricante (*One Lambda DNA/LMT versão 3.8*).

4. Avaliação Bioquímica

4.1. Glicemia

As amostras de sangue para a dosagem das glicemias foram colhidas com o anticoagulante, fluoreto de sódio-EDTA. O método utilizado foi o enzimático-colorimétrico, específico para glicose: sistema (glicose oxidase-peroxidase), kit comercial LABTEST GOD-ANA (Brasil). Os valores de glicose foram considerados normais entre 70 a 99 mg/dL, no plasma em jejum (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

4.2. Hemoglobina Glicada

O valor da hemoglobina glicada (HbA1c) nas amostras sanguíneas, colhidas em tubos contendo EDTA, foi obtido por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-HPLC (CLAE). Os valores normais foram de 4,1 a 6,0%.

4.3. Autoanticorpos pancreáticos: Anticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD) e antiproteína homóloga à tirosinafosfatase (anti-IA2)

As dosagens dos anticorpos anti-GAD e anti-IA2 foram realizadas por radioimunoensaio (RSR, UK), onde o antígeno recombinante (GAD 65 ou IA2) marcado com I^{125} foi incubado, à temperatura ambiente (para anti-GAD) e à 4 °C (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. O imunocomplexo marcado agregado foi separado por centrifugação e a quantificação de I^{125} , presente no precipitado contendo o imunocomplexo, foi efetuada em contador gama automático (Cobra II, Perkin-Elmer). A quantificação dos anticorpos foi realizada por extrapolação, a partir de curva padrão realizada no mesmo ensaio. Foram efetuadas curvas padrão com anti-GAD, com concentrações entre 0,1 U/mL a 300 U/mL, e com anti-IA2, entre 0,1 a 50 U/mL^{108,109}.

O nível médio de anti-GAD analisado em nosso laboratório em 787 indivíduos controles foi $0,11 \pm 0,46$ U/mL e os coeficientes de variação intra e inter-ensaio foram de 3 e 5,5% respectivamente.

Foram consideradas negativas as amostras com anti - GAD de ≤ 1 U/mL (98,9% dos controles); já os valores $>1,0$ U/mL foram considerados positivos.

Em relação ao anti-IA2, os valores médio da população controle foram $0,10 \pm 0,23$ U/mL. As amostras consideradas negativas variavam entre 0 a 0,8 U/mL (98,9%) e as variações intra e inter-ensaio foram 4,3% e 3,4%, respectivamente. Os valores $> 0,8$ U/mL foram considerados positivos.

4.4. Autoanticorpos extrapancreáticos:

relacionados a outras doenças auto-imunes

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

4.4.1. Anti-enzima adrenal 21-hidroxilase (anti-21OH)

Foram utilizados reagentes para radioimunoensaio de procedência RSR. O soro foi incubado com o antígeno 21-OH hidroxilase recombinante marcado com Iodo radioativo e o imunocomplexo obtido no final com proteína A foi separado por centrifugação. A presença de auto-anticorpo é avaliada diretamente das contagens radioativas automatizadas, e pela curva-padrão realizada no mesmo ensaio.

Considerado normal ou negativo valor menor ou igual a 1 UI/mL de unidade arbitrária.

4.4.2. Anti-célula parietal (anti-CP)

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

4.4.3. Anti-músculo liso (AML)

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

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

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

4.4.5. Anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA)

O método utilizado foi a Imunofluorescência indireta (IFI) em neutrófilos humanos de sangue periférico.

Valores de referência: Negativo (não reagente)

4.4.6. Fator anti-nuclear (FAN)

O método utilizado foi a Imunofluorescência indireta (IFI) em células HEp-2. Os anticorpos anti-nucleares reagem imunologicamente com constituintes macromoleculares do núcleo celular. Os padrões de imunofluorescência foram complementados por testes específicos para a detecção de autoanticorpos clinicamente significativos. Qualquer teste positivo (diluição 1/40) para anticorpos antinucleares por IFI em HEp-2 foi titulado até 1/1280.

Valores de referência: Negativo (não reagente)

4.4.7. Fator reumatóide (FR)

O método utilizado foi a Nefelometria. O fator reumatóide é um auto-anticorpo, geralmente da classe IgM, dirigido contra o fragmento Fc da IgG. Valor de referência: < 20 UI/mL.

4.4.8. Anti-tireoperoxidase (anti-TPO) e Anti-tireoglobulina (anti-TG)

O método utilizado foi o Fluoroimunoensaio indireto com os reagentes da AutoDELPHIA.

Valor de referência: < 35 U/mL

4.4.9. Anti-endomísio (anti-endom)

O método utilizado foi a Imunofluorescência indireta (IFI) em neutrófilos humanos de sangue periférico.

Valores de referência: Negativo (não reagente)

4.5.0. Anti-receptor do TSH (TRAB)

O método utilizado foi o Radiorreceptor, marcado com iodo radioativo, reagentes da RSR.

Valores de referência:< 8% negativo; 8 a 19% duvidoso; >19% positivo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição das variáveis numéricas foi verificada através do teste de Kolmogorov Smirnov. Aquelas com distribuição paramétrica foram comparadas através do teste *t de Student* e as distribuições não paramétricas, pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão.

A distribuição dos genótipos na população estudada foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, calculado pelo teste do *chi quadrado*.

A associação entre as variáveis nominais foi realizada através do teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer, utilizando o software SPSS 16.0 *for Windows* (SPSS Inc., Chicago, IL - USA)

Na análise das variantes alélicas observadas no gene da *IL-27p28*, utilizamos o modelo de dominância com presença ou ausência das variantes para diminuir o número de classes e elevar o poder estatístico da amostra.

A fase gamética dos haplótipos e as frequências dos possíveis haplótipos para cada indivíduo foram estimadas a partir dos genótipos de cada variante, através do método bayesiano implementado no programa PHASE v2.1.1.¹¹⁸.

O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. No estudo dos efeitos dos marcadores genéticos, o valor do p crítico foi considerado como aquele corrigido pelo método de Bonferroni.

RESULTADOS

1. Achados Clínicos

Foram analisados 614 indivíduos, sendo 318 pacientes portadores de DM1A e 296 controles saudáveis. As características destes dois grupos encontram-se na tabela 2 .

Os grupos não diferiram quanto a sexo ($p=0,39$) e etnia ($p=0,16$).

Pacientes DM1A apresentavam idade e níveis de peptídeo C inferiores aos do grupo controle, e valores mais elevados de glicemia, HbA1c e dos autoanticorpos pancreáticos ($p<0,001$) – tabela 3

Tabela 2: Características clínicas de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controles.

	N	Idade (anos)	Sexo		Etnia	
			F n(%)	M n(%)	C n(%)	NC n(%)
Pacientes	318	19,6±11,2	189(59,4)	129(40,6)	250(78,6)	67(21,1)
Controles	296	30,3±13,4	165(55,7)	131(44,3)	216(73,0)	77(26,0)

F: feminino M: masculino C: Caucasiana NC: Não Caucasiana

Tabela 3: Valores laboratoriais de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controles.

	Pacientes (média ± DP)	Controles (média ± DP)	P
Glicemia(mg/dL)	183,6±108,8	81,3±8,4	<0,001
HbA1C (%)	8,7±2,1	5,3±0,6	<0,001
Peptídeo C (U/mL)	0,5±0,4	2,3±1,4	<0,001
Anti-GAD65 (U/mL)	9,9±21,6	0,1±0,1	<0,001
Anti-IA2 (U/mL)	5,0±12,5	0,1±0,2	<0,001
Idade do diagnóstico(anos)	10,93±7,23	-	
Duração do diabetes (anos)	8,80±8,90	-	

Teste t de Student

2. Gene IL27p28

Foram identificadas oito variantes alélicas no gene da *IL27p28*, seis destas já descritas em banco de dados (*Ensembl Genome Browser*) a saber: rs153109(A/G) na região 5' proximal, rs34833(G/A) no íntron 1, rs26528(A/G) no íntron 2, rs17855750(T/G) no exon 2, rs181206 (T/C) no exon 4 e rs40837 (T/C) no exon 5, conforme descrição na figura 7.

As duas novas variantes alélicas compreenderam a substituição de uma citosina por uma timina na posição c.-347 na região 5' proximal (Figuras 8,9) e a substituição de uma guanina por uma citosina no exon 5, na posição c.498 G>C, levando à mudança do aminoácido, de ácido glutâmico para ácido aspártico, no resíduo 166 da sequência da proteína (Figuras 10,11).

Foram inicialmente seqüenciados 106 pacientes e 98 controles. Esta avaliação foi estendida para número maior de pacientes e controles para as variantes c.-347C>T e rs34833, associadas a menores valores de anticorpo anti-IA2 (0,032) e menor idade de diagnóstico dos pacientes diabéticos ($p=0,047$), respectivamente.

O polimorfismo rs153109(-964 A>G), na região promotora, que predispõem a outras doenças autoimunes em asiáticos, foi analisado por PCR-RFLP em 316 pacientes e 296 controles (e confirmado por seqüenciamento).

As frequências genotípicas destas variantes estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, nos pacientes com DM1A e Grupo Controle. As frequências dos alelos e genótipos estão demonstradas na tabela 4 .

Figura 7: Demonstração da região 5' proximal, regiões codificadoras e intrônicas, do gene da *IL-27p28*.

Região 5' Proximal
 >chromosome:GRCh37:16:28510083:28518755:-1
 AGCACTGACTCTCTCTGCGCCACCTCCCTCAGCCATCTGGTAAACCATAAGGGAGTCAGA
 TGACTCAAAACCCCGAATCCCCTCGGGTGGGCAATCCCCTTACCTGGCTATCCATCTTTG
 GAAGGACAGTAGACCCTAGGATGATGGTGGCAGAGC(C)GAGAATCAGGAGGGGGTTTGGGA
 CTCTGGGATCAACCAGTGAATAGGGCTGGATGGCTCACCCAAGCATGGGACATTGAGGAC

Figura 8: Localização da variante alélica não descrita no gene da *IL-27p28* na região 5' proximal:
 C/T

Figura 9: Eletroferograma de parte do gene da *IL-27p28*.

Painel A: paciente com DM1A sem a variante.

Painel B: paciente com DM1A com a substituição de citosina por timina na posição c.-347 na região 5' proximal. As setas indicam a localização da variante.

A variante c.-347(C>T) foi encontrada em dois pacientes, ambos em heterozigose, e foi ausente nos controles. A análise de predição de sítio de transcrição realizada através do programa TFSEARCH versão 1.3 não identificou perda ou criação de novo sítio de ligação para fatores de transcrição (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess>).

No exon 5, observamos a variante c.498 G>C , levando à substituição de uma guanina por uma citosina , com mudança do aminoácido, de ácido glutâmico para ácido aspártico no resíduo 166 da seqüência da proteína. (figura 12)

Esta variante foi identificada apenas em heterozigose, estando presente em 6 pacientes (5,7%) e 11 indivíduos controles (11,6%). Estes aminoácidos são quimicamente semelhantes, possuindo cadeia lateral com grupo negativo, ou seja, com grupamento ácido. O aminoácido não é conservado em outras espécies, de acordo com análise predição pelo *Polyphen*. (figura 13)

Exon 5
 GCCTCTCCTCACAGGTGCTGGCTGCAGGATTCAACCTCCCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAG
 AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGGGGCTGCTCCAGGGGCACTGGGCAGCGCCTTAC
 AGGGCCCGGCCAGGTGCTGCTGGCCCCAGCTCCTCTCCACCTACCGCCTGCTGCACTCCT

Figura 10: Localização da variante alélica não descrita no gene da *IL-27p28* no exon 5
 c.498: G/C

Figura 11: Eletroferograma de parte do gene da *IL-27p28*.

Painel A: paciente com DM1A sem a variante.

Painel B: paciente com DM1A com substituição de uma guanina por uma citosina na posição c.498 do exon 5. As setas indicam a localização da variante.

```

481 TCCAGGTGCTGGCTGCAGGATTCAACCTCCCGAGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAGG
458 TCCAGGTGCTGGCTGCAGGATTCAACCTCCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAGG
153 F--Q--V--L--A--A--G--F--N--L--P--E--E--E--E--E--E--E--E--E--E--

```

Figura 12: Análise da Proteína do gene da *IL-27p28*, composta por 243 aminoácidos, localizada no exon 5 – (resíduo 166 da sequência da proteína- posição c.498 GAG>GAC)

0	QUERY:	...RLDLRLDQRHLRFQVLAAGFNLPEE E EEEEEEEEEERKGLLPALGSALQG...
1	ref NP_001007521.1 interleukin 27 [Sus scrofa] >gi 55668298 gb ...	...RLDLRLDQQLHRLRFQVLAAGFNLPGQ E EEENEAG----RELLPGAPGGPSKP...
2	ref XP_001138224.1 PREDICTED: interleukin 27 [Pan troglodytes]	...-----
3	ref XP_849829.1 PREDICTED: similar to interleukin 27 [Canis fam...	...RLDLRLDQRHLRFQVLAAGFNLPEE V EEEEEEQHEERKGLLAAAPGGPSQT...
4	ref NP_663611.1 interleukin 27 [Mus musculus] >gi 21655253 gb A...	...RLDLRLDHRHLRFQVLAAGFKCSEE E DKEEEEEEEEEKKLPALGGPNQV...
5	ref XP_344963.3 PREDICTED: similar to interleukin 27 [Rattus no...	...RLDLRLDHRHLRFQVLAAGFNLPEE E EEEEEEEEEKKLLLPALGGPNQV...
6	ref XP_871671.1 PREDICTED: similar to interleukin 27 p28 subuni...	...RLDLRLDQQLHRLRFQVLAAGFNLPEE H ENEEE-----KGLLPALGAPLQI...
7	ref XP_001138643.1 PREDICTED: similar to IL-27 p28 subunit [Pan...	...-----
8	ref XP_001368843.1 PREDICTED: similar to IL-27 p28 subunit [Mon...	...QLDLRLDQSHLHFIKANGYCALED K ETQELEKRNLERFSLP-----
9	ref XP_001169965.1 PREDICTED: similar to IL-27 p28 subunit [Pan...	...-----VSVLAAGFNLPEE E EEEEEEEEE--RKGLLPALGSALQG...
10	ref XP_001097165.1 PREDICTED: similar to interleukin 27 [Macaca...	...-----QVLAAGFNLPEE E EEEEEEEEE--RKGLLPALGNASQG...

Figura 13: Alinhamento das sequências de aminoácidos para avaliação da conservação entre as espécies de acordo com o site de predição Polyphen: *Prediction of functional effect of human nsSNPs* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)

3. Frequência das variantes alélicas do gene da *IL-27p28* em pacientes DM1A e controles

As variantes alélicas, foram analisadas em relação aos seguintes parâmetros:

3.1. Susceptibilidade ao DM1A

Frequência dos genótipos e alelos das variantes no gene da *IL-27p28* em pacientes DM1A e Controles. As frequências dos genótipos e alelos das variantes no gene da *IL-27p28* não diferiram entre pacientes com DM1A e controles.(tabela 4)

Tabela 4: Frequências dos genótipos e alelos das variantes no gene da *IL-27p28* em portadores de DM1A e indivíduos controles.

Região	Variante	Genótipo	DM1A n(%)	Controles n(%)	P
Região 5' proximal	rs153109 A>G	AA	107(34,0)	97(33,1)	0,911
		AG/GG	209(66,0)	196(66,9)	
		A	380(60,3)	341(58,2)	0,459
		G	250(39,7)	245(41,8)	
Região 5' proximal	c.-347 C>T	CC	291(99,3)	196(100,0)	0,519*
		TC	02(0,7)	0	
		C	582(99,6)	392(100,0)	0,527*
		T	2(0,4)	0	
Intron 1	rs34833 G>A	GG	185(92,5)	161(88,5)	0,220*
		GA	15(7,5)	21(11,5)	
		G	383(96,2)	343(94,2)	0,259*
		A	15(3,8)	21(5,8)	
Intron 2	rs26528 A>G	AA	71(36,0)	66(36,3)	0,964
		AG/GG	126(64,0)	116(63,7)	
		A	237(60,2)	213(58,5)	0,701
		G	157(39,8)	151(41,5)	
Exon 2	rs17855750 T>G	TT	95(89,6)	79(84,9)	0,393*
		TG/GG	11(10,4)	14(15,1)	
		T	201(94,8)	174(91,6)	0,274*
		G	11(5,2)	16(8,4)	
Exon 4	rs181206 T>C	TT	66(62,3)	55(57,9)	0,626
		TC/CC	40(37,7)	40(42,1)	
		T	167(78,8)	145(76,3)	0,638
		C	45(21,2)	45(23,7)	
Exon 5	rs40837 T>C	TT	38(35,8)	37(38,9)	0,758
		TC/CC	68(64,2)	58(61,1)	
		T	131(61,8)	115(60,5)	0,875
		C	81(38,2)	75(39,5)	
Exon 5	c.498 G>C	GG	99(94,3)	84(88,4)	0,203*
		GC	06(5,7)	11(11,6)	
		G	206(97,2)	179(94,2)	0,221*
		C	06(2,8)	11(5,8)	

*Teste exato de Fisher /Teste qui-quadrado.

3.2. Sexo e Etnia

A frequência dos genótipos das variantes no gene da *IL-27p28* foi semelhante nos indivíduos do sexo masculino e feminino. Quanto à etnia, a maior frequência do polimorfismo na região 5' proximal c.-347 C>T em não caucasianos ($p=0,04$), não se confirmou após correção por Bonferroni ($P_c \leq 0,00625$). (tabela 5)

Tabela 5: Frequência dos genótipos das variantes no gene da *IL-27p28* em indivíduos do sexo masculino e feminino e segundo origem étnica.

Região	Variante	Genótipo	Masculino n(%)	Feminino n(%)	P	caucasiana n(%)	não caucasiana n(%)	P
Região 5' proximal	rs153109 A>G	AA	90(36,2)	114(32,3)	0,515	163(35,1)	41(28,5)	0,168
		AG/GG	166(64,8)	239(67,7)		301(64,9)	103(71,5)	
Região 5' proximal	c.-347 C>T	CC	173(98,9)	314(100)	0,128*	387(100,0)	96(98,0)	0,040*
		TC	2(1,1)	0		0 (0,0)	2(2,0)	
Intron 1	rs34833 G>A	GG	122(90,4)	224(90,7)	0,919*	264(90,7)	79 (89,8)	0,733
		GA	13(9,6)	23(9,3)		27(9,3)	10 (10,2)	
Intron 2	rs26528 A>G	AA	46(34,1)	91(37,3)	0,608	108(37,5)	28(31,8)	0,398
		AG/GG	89(65,9)	153(62,7)		180(62,5)	60(68,2)	
Exon 2	rs17855750 T>G	TT	79(92,9)	95(83,3)	0,052*	135(78,9)	36(83,7)	0,266*
		TG/GG	6(7,1)	19(16,7)		18(11,8)	7(16,3)	
Exon 4	rs181206 T>C	TT	53(61,6)	68(59,1)	0,832	96(61,9)	23(53,5)	0,409
		TC/CC	33(38,4)	47(40,9)		59(38,1)	20(46,5)	
Exon 5	rs40837 T>C	TT	32(37,2)	43(37,4)	0,979	60(38,7)	14(32,6)	0,576
		TC/CC	54(62,8)	72(62,6)		95(61,3)	29(7,4)	
Exon 5	c.498 G>C	GG	79(91,9)	104(91,2)	0,874	140(90,9)	42(97,7)	0,198*
		GC	7(8,1)	10(8,8)		14(9,1)	1(2,3)	

* *Teste de Fisher / Teste qui-quadrado* A significância foi verificada pela comparação com o p crítico corrigido por Bonferroni para 8 testes não independentes $P^* = 0,00625$

Frequência dos genótipos das variantes no gene da *IL-27p28* em pacientes portadores de DM1A.

Foram analisadas em relação aos seguintes parâmetros:

3.3. Idade de diagnóstico do DM1A

As variantes no gene da *IL-27p28*, não influíram na idade do diagnóstico. (tabela 6)

Tabela 6: Variantes alélicas no gene da *IL-27p28* e idade do diagnóstico de DM1A

Região	Variante	Alelo	Idade (anos±DP)		P
			Variante (+)	Variante (–)	
Região 5' proximal	rs153109	A/G	11,2±7,7	10,1±6,0	0,216
	A>G				
Região 5' proximal	c.-347	C/T	6,5±4,9	10,9±7,4	0,428
	C>T				
Intron 1	rs34833	G/A	11,7±8,5	10,6±7,7	0,618
	G>A				
Intron 2	rs26528	A/G	10,9±7,7	9,9±7,5	0,362
	A>G				
Exon 2	rs17855750	T/G	7,3±7,9	9,8±7,5	0,342
	T>G				
Exon 4	rs181206	T/C	9,4±6,4	9,7±8,2	0,822
	T>C				
Exon 5	rs40837	T/C	9,9±7,9	9,4±7,1	0,751
	T>C				
Exon 5	c.498	G/C	8,0±5,1	9,7±7,7	0,470
	G>C				

Teste *t* de Student

3.4. Auto-anticorpos pancreáticos e Peptídeo C

A influência das variantes no gene da *IL-27p28* na formação de autoanticorpos pancreáticos e na presença do peptídeo C, foi analisada apenas no subgrupo de pacientes com duração da doença até dois anos, considerando que as concentrações destas variáveis tendem a diminuir ou até a desaparecer com o decorrer do tempo.

A média dos valores séricos do anticorpo anti-GAD-65 foi de $12,5 \pm 18,8$ U/mL e do anti-IA2, de $10,3 \pm 18,7$ U/mL.

Variantes no gene da *IL-27p28* não influíram na frequência ou concentrações destes autoanticorpos. As associações da variante na posição c.498 G>C no exon 5, com a menor frequência ($p=0,045$) e concentração ($p=0,029$) do anticorpo anti-GAD-65 não se mantiveram após correção por Bonferroni. (tabelas 7 e 8)

Nenhuma variante favoreceu a preservação da reserva pancreática de insulina, avaliada pela presença de peptídeo C detectável e sua concentração sérica. (tabela 9).

Tabela 7: Frequências dos genótipos das variantes no gene da *IL-27p28*, e presença do anticorpo anti-GAD-65 e anti-IA2 nos pacientes portadores de DM1A com até dois anos de duração do diabetes.

Região	Variante	Genótipo	anti-GAD-65		P	anti-IA2		P
			(+) n(%)	(-) n(%)		(+) n(%)	(-) n(%)	
Região 5' proximal	rs153109 A>G	AA	17(25,8)	16(43,2)	0,068	25(33,3)	8(28,6)	0,645
		AG/GG	49(74,2)	21(56,8)		50(66,7)	20(71,4)	
Região 5' proximal	c.-347 C>T	CC	59(96,7)	32(100,0)	0,300*	66(97,1)	25(100,0)	1,000*
		TC	2(2,3)	0		2(2,9)	0	
Intron 1	rs34833 G>A	GG	40(97,6)	20(95,2)	1,000*	41(97,6)	19(95,0)	0,545*
		AG/AA	1(2,4)	1(4,8)		1(2,4)	1(5,0)	
Intron 2	rs26528 A>G	AA	14(34,1)	10(47,6)	0,303	15(35,7)	9(45,0)	0,483
		AG/GG	27(65,9)	11(52,4)		27(64,3)	11(55,0)	
Exon 2	rs17855750 T>G	TT	24(82,8)	17(100)	0,142*	27(87,1)	14(93,3)	1,000**
		TG/GG	5(17,2)	0		4(12,9)	1(6,7)	
Exon 4	rs181206 T>C	TT	29(63,0)	9(52,9)	0,277*	18(58,1)	11(73,3)	0,352*
		TC/CC	17(37,0)	8(47,1)		13(41,9)	4(23,7)	
Exon 5	rs40837 T>C	TT	8(27,6)	5(29,4)	1,000*	8(25,8)	5(33,3)	0,595
		TC/CC	21(72,4)	12(70,6)		23(74,2)	10(66,7)	
Exon 5	c.498 G>C	GG	29(100)	14(82,4)	0,045*	29(93,5)	14(93,3)	1,000*
		GC	0	3(17,6)		2(6,5)	1(6,7)	

Teste qui-quadrado / * Teste Exato de Fisher anti-GAD65- anticorpo antidescarboxilase do ácido lutâmico-65, anti-IA2 –anticorpo antitirosina fostatase

Tabela 8: Frequências dos genótipos das variantes no gene da *IL-27p28* e valores séricos dos anticorpos anti-GAD-65 e anti-IA2 em pacientes com até dois anos de duração do diabetes.

Região	Variante	Anti-GAD-65 (média DP)		P	Anti-IA2 (média DP)		P
		Variante (+)	Variante (-)		Variante(+)	Variante(-)	
Região 5' Proximal	rs153109 A>G	12,36 ± 17,31	10,57± 17,35	0,215	8,69 ± 10,82	13,12 ± 29,13	0,674
Região 5' Proximal	c.-347 C>T	7,55 ± 8,13	13,10 ± 19,80	0,731	23,50 ± 5,66	9,93 ± 19,34	0,060
Intron 1	rs34833 G>A	5,25 ± 6,01	15,42 ± 22,06	0,827	4,00 ± 5,66	8,64 ± 14,94	0,498
Intron 2	rs26528 A>G	12,76 ± 19,09	18,79 ± 25,47	0,971	7,51± 9,04	10,04 ± 20,97	0,767
Exon 2	rs17855750 T>G	20,57 ± 21,71	13,89 ± 21,22	0,174	8,79 ± 8,64	9,46 ± 17,22	0,791
Exon 4	rs181206 T>C	10,34 ± 18,80	17,13 ± 22,31	0,198	8,00 ± 10,35	10,20 ± 19,27	0,715
Exon 5	rs40837 T>C	12,67± 17,34	19,56 ± 28,90	0,932	7,19 ± 9,09	14,96 ± 27,32	0,651
Exon 5	c.498 G>C	0,30 ± 0,35	15,60 ± 21,50	0,029	3,13 ± 4,42	9,82 ± 16,90	0,504

*Teste de Mann-Whitney / anti-GAD-65 : anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico-65; anti-IA2: anti tirosina fosfatase

Tabela 9: Frequência dos genótipos das variantes no gene da *IL-27p28* em relação à presença do peptídeo C (valores $\geq 0,5$ U/mL) e seus valores séricos em pacientes portadores de DM1A com até dois anos de duração do diabetes

Região	Variante	PepC (média DP)		P	Genótipo	PepC (+) n(%)	PepC (-) n(%)	P
		Variante (+)	Variante (-)					
Região 5' Proximal	rs153109 A>G	0,7 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,6	0,401	AA	11(38,7)	11(31,4)	0,656
					AG/GG	19(63,3)	24(68,6)	
Região 5' Proximal	c.-347 C>T	0,5	0,7 $\pm$ 0,5	0,673	CC	29(100,0)	32(94,1)	0,495*
					TC	0	2(5,9)	
Intron 1	rs34833 G>A	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,6	0,220	GG	19(95,0)	25(96,2)	1,000*
					GA/AA	1(5,0)	1(3,8)	
Intron 2	rs26528 A>G	0,8 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,7	0,989	AA	6(30,0)	12(46,2)	0,364*
					AG/GG	14(70,0)	14(53,8)	
Exon 2	rs17855750 T>G	0,6 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,6	0,669	TT	17(94,4)	19(86,4)	0,613*
					TG/GG	1(5,6)	3(13,6)	
Exon 4	rs181206 T>C	0,5 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,7	0,182	TT	12(66,7)	14(63,6)	1,000*
					TC/CC	6(33,3)	8(36,4)	
Exon 5	rs40837 T>C	0,7 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,7	0,887	TT	4(22,2)	6(27,3)	1,000*
					TC/CC	14(77,8)	16(72,7)	
Exon 5	c.498 G>C	0,6 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,6	0,931	GG	17(94,4)	20(90,9)	1,000*
					GC	1(5,6)	2(9,1)	

*Teste exato de Fisher / qui- quadrado ; PepC – Peptídeo C

3.5. Autoanticorpos extra-pancreáticos

Foram analisados os seguintes autoanticorpos extra-pancreáticos: anti-21 Hidroxilase (anti-21OH), anti-célula parietal (anti-CP), anti-músculo liso (AML), anti-microsomal de fígado e rim (anti-LKM1), anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA), fator anti-núcleo (FAN), fator reumatóide (FR), anti-tireoglobulina (anti-TG), anti-endomísio (anti-endom), anti-tireoperoxidase (anti-TPO), anti-receptor do TSH (TRAB).

As variantes no gene da *IL-21p28* não influenciaram na frequência destes autoanticorpos.

A variante rs34833 predispôs à maior frequência de anticorpo anti-célula parietal (66,7% x 6,7%; $p= 0,02$) e a variante rs26528, à menor frequência do anticorpo antimúsculo liso (1,5% x 14,3%; $p= 0,027$). Porém estas diferenças não se confirmaram após correção por Bonferroni. (tabela 10)

Tabela 10: Variantes alélicas no gene da IL-27p28 e frequência de anticorpos extra-pacreaticos.

Anticorpo	rs153109			c.-347			rs34833			rs26528		
	n(%) (-)	n(%) (+)	P	n(%) (-)	n(%) (+)	P	n(%) (-)	n(%) (+)	P	n(%) (-)	n(%) (+)	P
21OH -	38(90,5)	89(92,7)		122(91,7)	2(100,0)		75(94,9)	7(87,5)		33(94,3)	15(100,0)	
+	4(9,5)	7(7,3)	0,734*	11(8,3)	0	1,000*	4(5,1)	1(12,5)	0,390*	2(5,7)	0	1,000*
C.P. -	34(94,4)	78(90,7)		109(92,4)	0		70(93,3)	1(33,3)		23(95,8)	48(88,9)	
+	2(5,6)	8(9,3)	0,722*	9(7,6)	0	-	5(6,7)	2(66,7)	0,020*	1(4,2)	6(11,1)	0,427*
M.liso -	25(80,6)	100(97,1)		121(93,0)	2(100,0)		83(94,3)	5(100,0)		24(85,7)	64(98,5)	
+	6(19,4)	3(2,9)	0,005a	9(7,0)	0	1,000*	5(5,7)	0	1,000*	4(14,3)	1(1,5)	0,027*
Mitoc -	26(100,0)	86(100,0)		104 (100,0)	1(100,0)		68(100,0)	4(100,0)		19(100,0)	53(100,0)	
+	0	0	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-
LKM -	22(100,0)	91(98,9)		110(99,1)	1		69(98,6)	4(100,0)		17(94,4)	56(100,0)	
+	0	1(1,1)	1,000*	1(0,9)	0	1,000*	1(1,4)	0	1,000*	1(5,6)	0	0,243*
Anca -	25(96,2)	81(97,6)		102(97,1)	0		62(95,4)	6(100,0)		18(90,0)	50(98,0)	
+	1(3,8)	2(2,4)	0,562*	3(2,9)	0	-	3(4,6)	0	1,000*	2(0,0)	1(2,0)	0,189*
FAN -	23(69,7)	81(70,4)		98(68,5)	1(100,0)		69(71,1)	4(80,)		28(80,0)	45(67,2)	
+	10(30,3)	34(29,6)	1,000*	45(31,5)	0	1000*	28(28,9)	1(20,0)	1,000*	7(20,0)	22(32,8)	0,248*
FR -	35(100,0)	98(96,1)		126(96,9)	2(100,0)		83(96,5)	3(75,0)		29(100,0)	57(93,4)	
+	0	4(3,9)	0,572*	4(3,1)	0	1,000*	3(3,5)	1(25,0)	0,169*	0	4(6,6)	0,301*
TTG -	12(100,0)	28(90,3)		37(92,5)	-		29(90,6)	4(100,0)		12(100,0)	21(87,5)	
+	0	3(9,7)	0,548*	3(7,5)	-	-	3(9,4)	0	1,000*	0	3(12,5)	0,536*
Endom-	25(89,3)	83(95,4)		105(93,7)	1(100,0)		78(96,3)	5(100,0)		31(100,0)	52(94,5)	
+	3(10,7)	4(4,6)	0,358*	7(6,3)	0	1,000*	3(3,7)	0	1,000*	0	3(5,5)	0,550*
TPO -	34(70,8)	99(76,7)		130(74,7)	2(100,0)		95(77,2)	6(66,7)		37(82,2)	64(73,6)	
+	14(29,2)	30(23,3)	0,438	44(25,3)	0	1,000*	28(22,8)	3(33,3)	0,438*	8(17,8)	23(27,4)	0,289*
Tireog. -	33(67,3)	98(76,6)		129(73,7)	2(100)		94(77,0)	7(77,8)		37(82,2)	64(74,4)	
+	16(32,7)	30(23,4)	0,251	46(26,3)	0	1,000*	28(23,0)	2(22,2)	1,000*	8(17,8)	22(25,6)	0,384*
TRAb -	28(93,3)	83(90,2)		110(90,9)	2		73(90,1)	6(100,0)		24(92,3)	55(90,2)	
+	2(6,7)	9(9,8)	1,000*	11(9,1)	0	1,000*	8(9,9)	0	-	2(7,7)	6(9,8)	1,000*

(-)negativo (+)positivo - (**anti-21OH**) 21 Hidroxilase, (**anti-CP**) célula parietal, (**AML**) músculo liso, (**anti-LKM1**) microssomal de fígado e rim, (**ANCA**)citoplasma de neutrófilo, (**FAN**) fator anti-núcleo (**FR**) fator reumatóide, (**anti-TG**)tireoglobulina, (**anti-TPO**)tireoperoxidase, (**anti-endom**)endomíio, (**TRAB**)anti-receptor do TSH.

Tabela 11: Variantes alélicas no gene da IL-27p28 e frequência de anticorpos extra-paquetários.

Anticorpo	rs17855750			rs181206			rs40837			c.498		
	n(%) (-)	n(%) (+)	P	n(%) (-)	n(%) (+)	P	n(%) (-)	n(%) (+)	P	n(%) (-)	n(%) (+)	P
21OH	-	34(94,4)	3(100,0)	1,000*	26(96,3)	11(91,7)	0,526*	16(100,0)	21(91,3)	0,503*	35(94,6)	2(100,0)
	+	2(5,6)	0		1(3,7)	1(8,3)		0	2(8,7)		2(5,4)	0
C.P.	-	29(93,5)	2(66,7)	0,249	16(84,2)	14(100,0)	0,244*	13(92,9)	17(89,5)	1,000*	28(90,3)	2(100,0)
	+	2(6,5)	1(33,3)		3(15,8)	0		1(7,1)	2(10,5)		3(9,7)	0
M.liso	-	42(95,5)	5(100,0)	1,000*	28(96,6)	19(95,0)	1,000*	12(85,7)	35(100,0)	0,077*	43(95,6)	4(100,0)
	+	2(4,5)	0		1(3,4)	1(5,0)		2(14,3)	0		2(4,4)	0
Mitoc	-	27(96,4)	4(100,0)	1,000*	16(94,1)	14(100,0)	1,000*	7(87,5)	23(100,0)	0,258*	27(96,4)	3(100,0)
	+	1(3,6)	0		1(5,9)	0		1(12,5)	0		1(3,6)	0
LKM	-	24(96,0)	3(75,0)	0,238*	15(88,2)	12(100,0)	0,498*	11(100,0)	16(88,9)	0,512*	25(92,6)	2(100,0)
	+	1(4,0)	1(25,0)		2(11,8)	0		0	2(11,1)		2(7,4)	0
Anca	-	36(64,3)	3(60,0)	1,000*	23(63,9)	16(64,0)	1,000*	12(63,2)	27(64,3)	1,000*	36(64,3)	3(60,0)
	+	20(35,7)	2(40,0)		13(36,1)	9(36,0)		7(36,8)	15(35,7)		20(35,7)	2(40,0)
FAN	-	39 (97,5)	4(100,0)	1,000*	25(100,0)	18(94,7)	0,432*	17(100,0)	26(96,3)	1,000*	39(97,5)	4(100,0)
	+	1(2,5)	0		0	1(5,3)		0	1(3,7)		1(2,5)	0
FR	-	11(91,7)	1(100,0)	1,000*	5(100,0)	7(87,5)	1,000*	5(100,0)	7(87,5)	1,000*	12(92,3)	-
	+	1(8,3)	0		0	1(12,5)		0	1(12,5)		1(7,7)	-
TTG	-	35(94,6)	5(100,0)	1,000*	22(100,0)	18(90,0)	0,221*	13(100,0)	27(93,1)	1,000*	37(94,9)	3(100,0)
	+	2(5,4)	0		0	2(10,0)		0	2(6,9)		2(5,1)	0
Endom	-	41(71,9)	7(100,0)	0,178*	32(78,0)	16(69,6)	0,551*	13(65,0)	35(79,5)	0,229*	44(73,3)	4(100,0)
	+	16(28,1)	0		9(22,0)	7(30,4)		7(35,0)	9(20,5)		16(26,7)	0
TPO	-	45(81,5)	6(85,7)	1,000*	33(82,5)	18(78,3)	0,745*	15(75,0)	36(83,7)	0,496*	47(79,7)	4(100,0)
	+	11(18,5)	1(14,3)		7(17,5)	5(21,7)		5(25,0)	7(16,3)		12(20,3)	0
Tireog.	-	32(88,9)	4(100,0)	1,000*	19(86,4)	17(94,4)	0,613*	11(84,6)	26(92,9)	0,584*	34(89,5)	2(100,0)
	+	4(11,1)	0		3(13,6)	1(5,6)		2(15,4)	2(7,1)		4(10,5)	0

(-)negativo (+)positivo - (**anti-21OH**) 21 Hidroxilase, (**anti-CP**) célula parietal, (**AML**) músculo liso, (**anti-LKM1**) microssomal de fígado e rim, (**ANCA**)citoplasma de neutrófilo, (**FAN**) fator anti-núcleo (**FR**) fator reumatóide, (**anti-TG**)tireoglobulina, (**anti-TPO**)tireoperoxidase, (**anti-endom**)endomísio, (**TRAB**)anti-receptor do TSH.

4. Frequência Estimada dos Haplótipos das variantes mais prevalentes no gene da *IL-27p28*.

A fase gamética dos haplótipos foi estimada através do programa PHASE (v2.1.1), de acordo com um método bayesiano¹¹⁹.

Foram reconstruídos 24 haplótipos diferentes com os dados das variantes alélicas para o locus *IL-27*, e estão descritos na tabela 12.

Tabela 12: Frequência dos haplótipos estimados

Identificação dos Haplótipos	Haplótipos	Número de Haplótipos
1	ACGATTTG	217
2	ACGATTGG	8
3	ACGATCTG	5
4	ACGAGTTG	2
5	ACGGTTTG	4
6	ACGGTCCG	1
7	ATGATTTG	1
8	GCGATTTG	6
9	GCGATTGG	2
10	GCGATCCG	2
11	GCGATCCC	2
12	GCGAGTCG	3
13	GCGGTTTG	1
14	GCGGTTCG	35
15	GCGGTTCG	2
16	GCGGTCTG	5
17	GCGGTCCG	61
18	GCGGTCCC	13
19	GCGGGTTG	4
20	GCGGGTCG	18
21	GCAATTTG	1
22	GCAATTGG	7
23	GCAATCCG	1
24	GTGGTTCG	1

Haplótipos: frequência > 5% em preto; < 5% em azul e < 1% em vermelho.

Os haplótipos mais frequentes foram: ACGATTTG (n= 217) -53,9%; GCGGTCCG (n= 61) - 15,2% e GCGGTTCG (n= 35)- 8,7%.

A partir dos haplótipos, obtivemos os genótipos de cada um dos indivíduos e comparamos as frequências genotípicas entre pacientes DM1A e controles.

O excesso de genótipos, no entanto, invalidou a comparação ($p=0,0109$) por haver muitas classes com menos de 5 indivíduos, mesmo quando os haplótipos com frequências inferiores a 5% foram agrupados tabelas 13.

Tabela 13. Frequência dos haplótipos das variantes do gene IL-27p28 em pacientes DM1A e indivíduos controles.

Haplótipos	Pacientes n(%)	<i>P</i>	Controles n(%)	<i>P</i>
1_1	25 (47,2)	0,311	28 (52,8)	0,347
1_14	15(62,5)	0,434	9(37,5)	0,484
1_17	20(54,0)	0,012	17(46,0)	0,014
1_X	29(58,0)	0,263	21(42,0)	0,293
14_14	0(0,0)	0,527	1(100,0)	0,588
14_17	3(50,0)	0,008	3(50,0)	0,009
14_X	1(50)	0,003	1(50,0)	0,003
17_17	4(100,0)	1,694	0(0,0)	1,890
17_X	0(0,0)	4,746	9(100,0)	5,296
X_X	5(55,6)	0,014	4(44,4)	0,015
14_X	0(0,0)	0,527	1(100,0)	0,588
17_X	1(100,0)	0,424	0(0,00)	0,473
X_X	3(75,0)	0,376	1(25,0)	0,419

X= haplótipos com frequência inferior a 5% ; P= contribuição no valor do Qui-quadrado

Uma outra estratégia foi então utilizada. A história mutacional dos haplótipos foi reconstruída com o auxílio do programa TCS¹²⁰, que produz uma genealogia de haplótipos pelo método de máxima parcimônia. A genealogia produzida possuía uma grande quantidade de ambiguidades que foram reduzidas, de acordo com os critérios propostos por Templeton et al. (1992)¹²¹. A genealogia desambiguada está apresentada na figura 14. Os haplótipos foram então divididos em dois grupos (A e B), correspondentes a dois clados principais da história evolutiva dos haplótipos. A partir dessa divisão, os genótipos foram reconstruídos, considerando os grupos filogenéticos, resultando em três genótipos (AA, AB e BB). Quando as frequências desses genótipos foram comparadas entre os grupos de pacientes e de controles, não houve diferença significativa entre os grupos DM1A e controles.(tabela 14)

5. Genealogia dos Haplótipos (história evolutiva)

Figura 14 : genealogia dos haplótipos¹²⁰

Tabela 14 -Genótipos agrupados em relação aos clados dos pacientes DM1A e Controles

DM1A			CONTROLES		
AA	AB	BB	AA	AB	BB
1 - 1 = 25	1 - 10 = 1	11 - 12 = 1	1 - 1 = 28	1 -12 = 1	10 -23=1
1 - 2 = 3	1 - 12 = 1	14 - 17 = 3	1 - 2 = 3	1 -13 = 1	11- 14=1
1 - 3 = 2	1 - 14 = 15	14 - 22 = 1	1 - 3 = 1	1 -14 = 9	14 -14 =1
1 - 5 = 1	1 - 17 = 20	16 - 16 = 1	1 - 4 = 1	1 -15 = 2	14 -17 =3
1 - 7 = 1	1 - 18 = 5	17 - 17 = 4		1 -16 = 2	14 -18 =1
1 - 8 = 5	1 - 19 = 1	20 - 22 = 1		1 -17= 16	16 -21 =1
1 - 9 = 2	1 - 20 = 5	20 - 24 = 1		1 -18 = 2	17 -18 =4
2 - 2 = 1	1 - 22 = 2	6 - 22 = 1		1 -19 = 2	17-20 = 5
3 - 5 = 1	5 - 17 = 1			1- 20 = 4	20-20 = 1
4 - 8 = 1				1 -22= 2	
				3 -19 = 1	
				5 -18 =	
				1	

6. Sistema HLA

Frequência dos genótipos HLA-DR em pacientes DM1A e indivíduos controles

Duzentos e quarenta e oito pacientes (78,5%) e cento e quatro indivíduos controles (35,1%) apresentaram pelo menos um alelo HLA de risco para DM1A (-DR3 e/ou -DR4). A frequência destes alelos foi maior nos pacientes: OR = 5.541 (95% IC: 3,85-7,98) e $P < 0,0001$. (tabela 15)

Tabela 15: Frequência dos genótipos do sistema HLA-DR em pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle.

Alelos HLA	Pacientes n (%)	Controles n (%)
DR3/DR3	26(8,2)	3(1,0)
DR3/DR4	83(26,1)	4(1,3)
DR4/DR4	16(5,0)	4(1,3)
DR3/ X	61(19,2)	49(16,6)
DR4/Y	62(19,5)	44(14,9)
X/Y	68(21,4)	158(53,4)
Não avaliado	2(0,6)	34(11,5)

X e Y = alelos HLA diferente de -DR3 e -DR4

A frequência das variantes no gene da *IL-27p28* não diferiu entre os indivíduos com e sem alelos HLA de risco para o DM1A. (Tabela 16)

Tabela 16: Frequência dos genótipos das variantes no gene da *IL-27p28* em indivíduos portadores ou não dos alelos HLA –DR3 e/ou –DR4

Região	Variante	Genótipo	HLA de risco (+) n(%)	HLA de risco (-) n(%)	P
Região 5' proximal	rs153109	AA	119(31,6)	64(30,8)	0,826
	A>G	AG/GG	257(68,4)	144(69,2)	
Região 5' proximal	c.-347	CC	319(99,4)	148(100,0)	0,336*
	C>T	TC	2(0,6)	0	
Intron 1	rs34833	GG	207(90,4)	121(90,3)	0,977*
	G>A	GA	22(9,6)	13(9,7)	
Intron 2	rs26528	AA	85(37,6)	46(34,3)	0,532
	A>G	AG/GG	141(62,4)	88(65,7)	
Exon 2	rs17855750	TT	104(88,1)	56(88,9)	0,880*
	T>G	TG/GG	14(11,9)	7(11,1)	
Exon 4	rs181206	TT	72(61,0)	38(59,4)	0,829
	T>C	TC/CC	46(39,0)	26(40,6)	
Exon 5	rs40837	TT	42(35,6)	26(40,6)	0,513
	T>C	TC/CC	76(64,4)	38(59,4)	
Exon5	c.498	GG	112(94,9)	58(90,6)	0,265*
	G>C	GC	06(5,1)	06(9,4)	

*Teste exato de Fisher / Teste Chi-quadrado

Alelos específicos HLA de risco para DM1A: -DR3 e /ou -DR4

DISCUSSÃO

O diabetes *mellitus* tipo 1 A (DM1A) é uma doença metabólica crônica autoimune, órgão específica, caracterizada pela deficiência de insulina decorrente da destruição das células β pancreáticas pelos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ autoreativos, linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. O processo inflamatório local, coordenado por fatores genéticos e ambientais não totalmente esclarecidos, conta, ainda, com a participação ativa de várias citocinas. Estas, ao determinarem a diferenciação das células T $CD4^+$, iniciam, direcionam, mantêm ou finalizam a resposta imune. Várias citocinas estão implicadas no processo de destruição das células β pancreáticas.

A IL-27, citocina heterodimérica, funcional e estruturalmente relacionada à família da IL-12^{103,104}, é composta pelas subunidades p28 e EBI3 e exerce seus efeitos através de receptores formados pelas cadeias WSX-1 (TCCR) e Gp130¹⁰³.

Após ligar-se ao seu receptor, atua através de vários reguladores de transcrição do sinal (STAT1, STAT3, STAT4, STAT5 e T-bet) e esta diversidade de ações está implicada nas inúmeras funções da IL-27 na regulação da resposta imune e autoimune^{85,95,122,123}. A IL-27 induz a diferenciação do subtipo de células T_H1 , que têm forte impacto na defesa inicial contra patógenos intracelulares, produzindo citocinas como IFN γ , IL-12 e fator citotóxico linfotóxica¹²⁴ via ativação de STAT1 e T-bet. Por outro lado, ao limitar a intensidade da resposta imune e inflamatória via STAT3, suprimindo a proliferação de células efectoras $Th2$ e de memória e a produção de várias citocinas inflamatórias como a IL-17, exerce ação supressora na resposta imune por atenuar a intensidade e duração da ativação de células T, limita doenças inflamatórias e autoimunes.

Desta forma, o papel da IL-27 nas doenças autoimunes é ainda controverso, tendo-lhe sido atribuída atuação, tanto ativadora como supressora da inflamação.

Várias condições inflamatórias cursam com aumento de sua expressão.

Camundongos NOD têm níveis elevados de IL-27 e de citocinas inflamatórias como a IL-17 e o INF γ , diminuição de citocinas anti-inflamatórias e de linfócitos Th2 e de células Treg⁸³. É citocina essencial na artrite induzida por proteoglicanos, onde direciona a via Th1 e a produção de IFN- γ ¹²⁵. A IL-27 parece atuar como citocina pró-inflamatória nas situações que dependem da geração de anticorpos de alta afinidade. De forma semelhante, na hepatite induzida por concanavalina A e na colite induzida por oxazorolone, a IL-27 exacerba a inflamação¹²⁶. A superprodução de IL-27 tem ainda papel importante na patogênese da esclerose sistêmica, especialmente nas fases iniciais da doença. Tem correlação com a extensão da fibrose de pele e da fibrose pulmonar com anomalias imunológicas e produção de autoanticorpos. A determinação da IL-27 sérica foi, inclusive, sugerida como marcador da gravidade da doença em relação aos autoanticorpos^{88,127}. A expressão de IL-27 está também aumentada em doenças granulomatosas como a tuberculose e a sarcoidose, na doença de Crohn¹²⁸ e em modelos animais de uveíte e esclerose múltipla. O mesmo ocorre nos sítios de inflamação pelas infecções por *Trichuris muris*, *Toxoplasma gondii* e *Leishmania major*, onde o controle de parasitoses depende, primariamente, de linfócitos T_H1^{93,105}.

A IL-27 ainda parece promover a apresentação de antígenos, regulando a expressão de moléculas MHC de classe I e classe II¹²⁹. Por outro lado, a IL-27 favorece, não apenas a diferenciação T_H1, mas pode ao mesmo tempo suprimi-la impedindo a inflamação excessiva. Animais *knockout* para o receptor de IL-27 podem manter a capacidade de eliminar o patógeno (pois a deficiência da resposta T_H1 é temporária), mas ter evolução letal frente às graves lesões teciduais, secundárias às reações inflamatórias exacerbadas¹³⁰ decorrentes da falta do controle da IL-27.

A IL-27 estimula a diferenciação de células Treg e a produção de IL-10, com propriedades imunossupressoras e reduz a produção de IFN- γ .

Também inibe a diferenciação de células T_H2. Camundongos *knockout* para o receptor de IL-27 têm resposta T_H2 aumentada, permitindo o rápido controle de infecções por parasitas (*Trichuris muris*)¹⁰¹. Também têm hiper-

responsividade de vias aéreas pela ação T_H2 , propiciando a asma¹¹³. Administração intranasal de IL-27 atenua o quadro respiratório⁸⁵. IL-27 ainda suprime os linfócitos T_H17 , associados a várias desordens imunológicas como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla artrite induzida por colágeno e encefalite experimental autoimune^{76,78,79,131,132} e nesta última condição, inibe a expressão de IL-17 nas células T^{133} e aumenta a quantidade de IL-10, regulando a capacidade patogênica das células T_H7 na encefalite¹³⁴.

Por todas estas ações moduladoras, pode ter implicações terapêuticas nas condições de autoimunidade e atuar, também como agente anti-viral, aumentando a produção de interferons¹³⁵. O ambiente de citocinas parece direcionar as diversificadas ações da IL-27. Na presença de IL-12, no caso de infecção por patógenos, com forte polarização T_H1 , a IL-27 tem efeito supressor. Na artrite induzida por proteoglicanos, onde predomina a resposta T_H2 , a atividade primária de IL-27 é a T_H1 ¹²⁵. Deficiência de IL-27 prejudica a resposta rápida contra infecções, permitindo o estabelecimento de infecções persistentes, aumenta a atividade das células T_H2 e T_H17 , favorecendo a asma e as doenças inflamatórias.

Frente à intensa atividade da IL-27 na resposta imune, tanto ativadora como moduladora, seria importante o conhecimento de sua atuação no diabetes autoimune do homem, contemplando, particularmente, o seu efeito supressor sobre as células T_H17 e estimulador da expressão da IL-21 e de seu receptor em linfócitos T e B¹¹⁴. Pacientes com DM1A de início recente têm diminuição da expressão de receptores de IL-17 e IL-21 em linfócitos T $CD3^+$ e $CD4^+$ periféricos e do número de células Treg, sugerindo implicação da IL-27^{80,81}.

Embora análise recente do *genome-wide association studies* (GWAS) não tenha confirmado a IL-27 como gene candidato à predisposição ao DM1A em caucasianos, apenas uma variante alélica foi explorada(rs4788084)¹³⁶.

Estudos em populações asiáticas apontam para o polimorfismo g.-964 A>G no gene da *IL27p28*, como fator de risco na susceptibilidade à asma e processos alérgicos, dependentes de T_H2 ⁶⁹, e à doença pulmonar obstrutiva crônica¹⁰⁷. Também está associado à colite ulcerativa, doença de Crohn¹¹⁵, e

infecção crônica pelo vírus da hepatite B¹¹⁶. Os níveis de IL-27 estavam elevados nesta última.

De posse destas informações, optamos por investigar alterações no gene da *IL-27p28* que pudessem estar associados à predisposição ao diabetes *mellitus* tipo 1 autoimune.

A nossa casuística constou de 614 indivíduos, sendo 318 pacientes portadores de DM1A (129M/189F) e 296 indivíduos controles (131M/165F). O sequenciamento da região 5' proximal e da região codificadora do gene da *IL-27p28* evidenciou oito variantes alélicas, seis destas já descritas em Banco de Dados: rs153109(A/G) na região 5' proximal, rs34833 (G/A) no íntron 1, rs26528 (A/G) no íntron 2, rs17855750 (T/G) no exon 2, rs181206 (T/C) no exon 4 e rs40837 (T/C) no exon 5.

Identificamos duas novas variantes alélicas. A variante c.-347 (C>T), com substituição de uma citosina por uma timina, foi observada em apenas dois pacientes, ambos em heterozigose, mas não nos controles. A análise de predição de sítio de transcrição realizada através do programa TFSEARCH versão 1.3 não identificou perda ou criação de novo sítio de ligação para fatores de transcrição (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess>). A mesma variante foi observada em familiar paterno de um dos pacientes analisados, saudável, apresentando anticorpos pancreáticos negativos e parâmetros bioquímicos dentro da normalidade (dados não apresentados). A segunda variante, na posição c.498 exon 5, G>C, leva à substituição do aminoácido ácido glutâmico pelo ácido aspártico (GAG>GAC) no resíduo 166 da sequência da proteína, tendo sido identificada apenas em heterozigose, em 6 (5,7%) pacientes e 11 (11,6%) indivíduos controles. Estes aminoácidos são quimicamente semelhantes, e não alteram a proteína. A análise através de *site* de predição Polyphen: *Prediction of functional effect of human nsSNPs* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), indica que a mudança do aminoácido é tolerável e não conservada em algumas espécies. Resultado semelhante foi obtido no *site* de predição: SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), o qual prevê se a substituição de um aminoácido afeta a função da proteína com base na

homologia de sequência e as propriedades físicas dos aminoácidos: a substituição E166D, é predita ser tolerável, com *score* de 0.37.

No entanto, nenhum dos polimorfismos se configurou como fator de risco para DM1A. As frequências dos alelos e genótipos das variantes (n=8) das regiões codificadoras e 5' proximal do gene da *IL-27p28*, não diferiram entre os pacientes com DM1A e os indivíduos controles .

Os vinte e quatro haplótipos estimados, contemplando estas oito variantes alélicas do gene da *IL-27p28*, foram também analisados. Os mais frequentes foram: ACGATTTG n= 217 (53,9%), GCGGTCCG n= 61 (15,2%) e GCGGTTCCG n= 35 (8,7%). Também não houve diferença na frequência dos haplótipos dos pacientes DM1A e controles quando se considerou todos os haplótipos, os mais frequentes, os mais raros (com frequência inferior a 5%) e os haplótipos agrupados por genealogia.

Os resultados sugerem que alterações no gene da *IL-27p28* e sua região 5' proximal não estão relacionadas com a susceptibilidade ao DM1A na nossa população. Os níveis elevados de IL-27 observados em camundongos NOD diabéticos talvez se devam a alterações pós-transcricionais, na dependência de citocinas do ambiente inflamatório.

De forma semelhante, a frequência genotípica das variantes alélicas do gene da *IL-27p28* não diferiu em relação aos dados clínicos e laboratoriais como: sexo, origem étnica, idade de diagnóstico do diabetes, presença e títulos dos autoanticorpos pancreáticos anti-GAD65 e anti-IA2 e presença de autoanticorpos extra-pancreáticos. Podemos inferir que polimorfismos no gene da *IL-27p28* não direcionam para imunidade humoral mais intensa, contemplando a produção de autoanticorpos pancreáticos e extrapancreáticos. Considerando que autoanticorpos são marcadores reconhecidos da agressão imune, variantes no gene da *IL-27p28* não parecem atuar na predisposição a outras doenças autoimunes.

A presença de peptídeo C, decorridos até dois anos do diagnóstico de diabetes, pode espelhar um processo mais lento e menos agressivo de destruição imune das células β . O peptídeo C reflete a reserva pancreática de insulina e, indiretamente, o grau de agressividade do ataque imune

Nenhuma das variantes alélicas estudada foi associada à preservação do peptídeo C e, assim, não predispueram à atenuação do processo de auto-agressão.

As avaliações sobre a influência das variantes no fenótipo do DM1A têm limitações. Para alguns autoanticorpos, o número de pacientes analisados foi pequeno. As frequências das variantes c.-347C>T, rs34833, rs17855750 e c.498G>C foram baixas tanto entre os diabéticos (entre 0,4 e 5,2%) como entre os controles (entre zero e 8,4), o que comprometeu a análise. Como também não induzem alterações na proteína, é pouco provável que possam influir no risco para diabetes ou produção de autoanticorpos. A variante rs153109, que contou com a inclusão de maior número de pacientes, também não influenciou na predisposição ou características clínicas e laboratoriais do DM1A. A sua influência na predisposição à formação de autoanticorpos também não se confirmou quando incluímos o grupo controle (dados não apresentados).

Nossos dados diferem daqueles das populações asiáticas, para as quais os polimorfismos rs153109, e rs181206 foram fatores de risco para algumas doenças autoimunes.

Esta diferença talvez se deva a diferenças étnicas. A distribuição do alelo G da variante rs153109 na nossa população controle (41,8%) foi semelhante à dos asiáticos (30 a 45,5%), mas a frequência do alelo C da variante rs181206 foi maior no nosso meio (23,7% contra 9,5 a 11,3%).

Embora o tamanho de nossa amostra possa ter limitado o poder estatístico do estudo, ela não foi diferente da amostra das populações asiáticas, reafirmando que variantes no gene da *IL-27p28* não predisõem ao diabetes autoimune no nosso meio.

Outra possibilidade é que os polimorfismos citados não sejam os verdadeiros responsáveis pela predisposição à autoimunidade, mas estejam em desequilíbrio de ligação com outra variante predisponente ainda não identificada.

Em relação aos alelos HLA-DR, 85,0% dos pacientes e 40,0% dos indivíduos controles apresentaram ao menos um alelo HLA de risco para DM1A (-DR3 e/ou -DR4). A frequência destes alelos foi maior nos pacientes, conferindo risco para a doença de 8,585 (IC 5,78-12,7); $p < 0,0001$, à semelhança do observado em outras populações diabéticas, confirmando este locus como o grande responsável pela susceptibilidade à doença.

CONCLUSÕES

Observamos oito variantes alélicas nas regiões codificadoras e 5' proximal do gene da *IL-27p28*, sendo duas delas (em heterozigose) nas posições: c.-347 C>T na região 5' proximal e na posição c.498 do exon 5 (E166D) (G>C) ainda não descritas em bancos de dados.

Nossos resultados sugerem que variantes alélicas no gene da *IL-27p28*.

- não estão relacionadas á susceptibilidade ao diabetes tipo 1 A.
- não estão relacionadas ao sexo e origem étnica.
- não influem na idade do diagnóstico do diabetes e na produção de autoanticorpos pancreáticos e extra pancreáticos.

ANEXOS**ANEXO 1 – Aprovação da Comissão de Ética - CAPPesq** **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/05/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0233/08**, intitulado: **"PRESENÇA DE MUTAÇÕES OU POLIMORFISMOS NO GENE DA INTERLEUCINA 27(IL-27) EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 AUTOIMUNE"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva**

Pesquisador (a) Executante: **Aritania Sousa Santos**

CAPPesq, 19 de Maio de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº _____ SEXO M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO ____/____/____
 ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO _____
 BAIRRO _____ CIDADE _____
 CEP _____ TELEFONE DDD (____) _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) _____
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE _____ SEXO M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO ____/____/____
 ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO _____
 BAIRRO _____ CIDADE _____
 CEP _____ TELEFONE DDD (____) _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

1-TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: PRESENÇA DE MUTAÇÕES E/OU POLIMORFISMOS NO GENE DA INTERLEUCINA 27 EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO I AUTOIMUNE

2-PESQUISADOR : Dra Maria Elizabeth Rossi da Silva

CARGO/FUNÇÃO: Médica

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA Nº 19.981

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4 DURAÇÃO DA PESQUISA 03 anos

- 1 – Desenho do estudo e objetivo(s): Este estudo ajudará no conhecimento dos genes que favorecem o aparecimento de diabetes e outras doenças autoimunes. Doenças autoimunes são aquelas nas quais o próprio organismo agride e destrói seus órgãos e tecidos. Também serão dosados os anticorpos produzidos contra o pâncreas, articulações, tireóide, intestino, fígado e músculos. Parte do sangue colhido será armazenado em Freezer para estudo futuro de outros genes que possam favorecer o aparecimento de diabetes tipo 1.
- 2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: não há
- 3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção da veia do antebraço (15mL)
- 4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:
Desconforto, dor e hematoma no local da coleta de sangue
- 5 – Benefícios para o participante: Este estudo ajudará no conhecimento dos genes relacionados aos diabéticos no Brasil e na definição das pessoas com risco de desenvolverem a doença, que poderão vir, no futuro, a ser submetidas a tratamento para prevenir diabetes.
- 6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Orientações no tratamento do diabetes, incluindo alimentação, atividade física, medidas de glicemia de ponta de dedo e uso de insulina para os pacientes com diabetes.
- 7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 – sala 3324, Telefone(s) 3061-7259(FMUSP). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovidio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
- 09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.
- 10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
- 11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 12 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.
- 13 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: Presença de Mutações e/ou Polimorfismos no Gene da Interleucina 27 em Pacientes Portadores de Diabetes Mellitus Tipo I Autoimune.

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

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

ANEXO 3 – Frequência dos Genótipos e alelos das variantes no gene da *IL-27p28* em pacientes portadores de DM1A e controles.

Região	Variante	Genótipo	Pacientes DM1 A n(%)	Controles n(%)	Alelo	Pacientes DM1A n(%)	Controles n(%)
Região 5' Proximal	rs153109 (A>G)	AA	107(33,8)	97(33,1)	A G	382(60,4) 250(39,6)	341(58,2) 245(41,8)
		AG	168(53,2)	147(50,2)			
		GG	41(13,0)	49(16,7)			
Região 5' proximal	c.-347 (C>T)	CC	290(99,3)	181(100,0)	C	582(99,6)	362(100,0)
		TC	02(0,7)	0	T	2(0,4)	0
Intron 1	rs34833 (G/A)	GG	185(92,5)	161(88,5)	G	385(96,2)	343(94,2)
		GA	15(7,5)	21(11,5)	A	15(3,8)	21(5,8)
Intron 2	rs26528 (A/G)	AA	71(36,0)	66(36,3)	A G	237(60,2) 157(39,8)	213(58,5) 151(41,5)
		AG	95(48,2)	81(44,5)			
		GG	31(15,8)	35(19,2)			
Exon 2	rs7855750 (T/G)	TT	95(89,6)	80(84,2)	T	201(94,8)	174(91,6)
		TG	11(10,4)	14(14,7)	G	11(5,2)	16(8,4)
		GG	0	01(1,1)			
Exon 4	rs181206 (T/C)	TT	66(62,3)	55(57,9)	T	167(78,8)	145(76,3)
		TC	35(33,0)	35(36,8)	C	45(21,2)	45(23,7)
		CC	05(4,7)	05(5,3)			
Exon 5	rs40837 (T/C)	TT	38(35,8)	37(38,9)	T	131(61,8)	115(60,5)
		TC	55(51,9)	41(43,2)	C	81(38,2)	75(39,5)
		CC	13(12,3)	17(17,9)			
Exon 5	c.498 (G/C)	GG	100(94,3)	84(88,4)	G	206(97,2)	179(94,2)
		GC	06(5,7)	11(11,6)	C	06(2,8)	11(5,8)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes. Diabetes Care. 2007;30 (Supl 1):S42-7
- 2- Balda, C.A., Silva, A.P. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. Rev Ass Med Brasil 1999; 45(2): 175-80
- 3- Rossi, M.E.R., Mory, D., Davini, E. Marcadores Genéticos e Auto-Imunes do Diabetes Melito Tipo 1: da Teoria para a Prática – Arquivos Brasileiros 2008
- 4- Sesterheim, P., Saitovitch D., Staub H.L. Diabetes *mellitus* tipo 1: Multifatores que conferem susceptibilidade à patogenia auto-imune – Scientia Medica, Porto Alegre. v 17, n 4, p.212-217, out/dez/2007.
- 5- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. Lancet, 1998;352:854-65.
- 6- Liu, E., Eisenbarth, G.S. Type 1A diabetes *mellitus*-associated autoimmunity. Endocrinol Metab Clin North Am. 2002;31:391-410 .
- 7- Devendra, D., Liu E., Eisenbarth, G.S.Type1 diabetes:recent developments. MJ.2004 ;328 :750-4.
- 8- Rewers, M., Klingensmith G.J. Prevention of type 1 diabetes. Diabetes Spectr. 1997;10:282-92.
- 9- Cesarini, P.R., Mendonça E., Fernandes V., et al. Prevalência dos marcadores imunológicos anti-GAD e anti-IA2 em parentes de primeiro grau de diabéticos do tipo 1 em amostra da população da grande São Paulo. Ver Assoc Méd Brás. 2003;49:395-400.
- 10- Jahromi, M.M., Eisenbarth, G.S. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. Cell Mol Life Sci. 2007;64(7-8):865-72.
- 11- Karvonen, M., Viik-Kajander, M., Moltchanova, E., Libman, I., La- Porte, R., Jaakko, T. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide.Diabetes Care. 2000;23(10):1516-26.
- 12- Eisenbarth,G.S., Lafferty,K. Type 1 diabetes: cellular, molecular and clinical immunology. Disponível em: <http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/books.html>.
- 13- Pihoker, C., Gilliam, L.K., Hampe, C.S., Lernmark, A. Autoantibodies in diabetes. Diabetes. 2005;54 Suppl 2:S52-61.

- 14-** Kantárová, D., Buc, M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. *Physiol Res.* 2007;56(3):255-66.
- 15-** Mattana, T.C., Costa, V.S., Correa, M.R.S., Santos, A.S., Rossi, F.B., Mainardi-Novo, D., Nery, M., Davini, E., Crisostomo, L.G., Gamberini, M., Ruiz, M.O., Fukui, R.T., Silva, M.E.R. Estudo Epidemiológico de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 A (DM1A) do ambulatório de diabetes do hospital das clínicas da FMUSP. Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo-Águas de São Pedro – 2010 –Pôster.
- 16-** Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001;358:221-9.
- 17-** Delovitch, T.L., Singh, B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets NOD. *Immunity.* 1997;7:727-38.
- 18-** Rosmalen, J.G.M., Leenen, P.J.M., Pelegri, C., et al. Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:209-14.
- 19-** Eisenbarth, G.S. Animal models of type 1 diabetes: genetics and immunological function. In *Type 1 diabetes: molecular, cellular and clinical immunology*, citado 2005 ago 2.
- 20-** Salminen, K.K., Vuorinen, T., Oikarinen, S., et al., Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2004;21:156-64.
- 21-** Fernandes, A.P.M., Pace, A.E., Zanetti, M.L., et al. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes *mellitus* do tipo 1. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2005;13:743-9.
- 22-** Kulmala, P., Savola, K., Reijonen, H., et al., Genetic markers, humoral autoimmunity, and prediction of type 1 diabetes in siblings of affected children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes.* 2000;49:48-58.
- 23-** Woo, W., LaGasse, J.M., Zhou, Z., et al. A novel high-throughput method for accurate, rapid, and economical measurement of multiple type 1 diabetes autoantibodies. *J Immunol Methods.* 2000;244:91-103.
- 24-** Yang, X.D., Michie, A.S., Mebius, R.E., et al., The role of cell adhesion molecules in the development of IDDM. Implications for pathogenesis and therapy. *Diabetes.* 1996;45:705-10.

- 25-** Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Sorensen, O., Bleackley, R.C. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in pancreatic islets of nonobese diabetic mice: identification of iNOS-expressing cells and relationships to cytokines expressed in the islets. *Endocrinology* 1996; 137: 2.093-99.
- 26-** Achenbach, P., Bonifacio, E., Koczwara, K., Ziegler, A.G. Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54 (Suppl 2):S25-31.
- 27-** Park, Y. Functional evaluation of the type 1 diabetes (T1D) susceptibility candidate genes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77 (Suppl 1):S110-5.
- 28-** Davini, E., Silva, M.E.R., Alves, L.I., Correia, M.R.S., Fukui, R.T., Latrônico, A.C., *et al.* O genótipo I/I do locus VNTR do gene da insulina confere risco independente para diabetes mellitus tipo 1 nos pacientes sem os genótipos DRB1 e DQB1 de susceptibilidade. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005;49 (Suppl 2):S876.
- 29-** Verge, C.F., Gianani, R., Kawasaki, E., *et al.* Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 1996; 45: 926- 32.
- 30-** Bingley, P.J., Bonifacio, E., Williams, A.J.K., *et al.* Prediction of IDDM in the general population. Strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 1997; 46: 1.701- 10.
- 31-** Abbas, A.K., Lichtman, A.H. *Imunologia Celular e Molecular – 5ª Edição* - Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- 32-** Alizadeh, B.Z., Koeleman, B.P. Genetic polymorphisms in susceptibility to type 1 diabetes. *Clin Chim Acta*. 2008;387(1-2):9-17.
- 33-** Faas, S., Trucco, M. The genes influencing the susceptibility to IDDM in humans. *J Endocrinol*. 1994;17:477-495.
- 34-** Rewers, A., Babu, S., Wang, T.B., Bugawan, T.L., Barriga, K., Eisenbarth, G.S., Erlich, H.A. Ethnic differences in the associations between the HLA-DRB1*04 subtypes and type 1 Diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1005:301-309.
- 35-** Kawabata, Y., Ikegami, H., Kawaguchi, Y., Fujisawa, T., Shintani, M., Ono, M. *et al.* Asian-Specific HLA haplotypes reveal heterogeneity of the contribution of HLA-DR and DQ haplotypes to susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:545-51.
- 36-** Kanga, U., Vaidyanathan, B., Jaini, R., Menon, P.S.N., Mehra, N.K. HLA haplotypes associated with type 1 Diabetes Mellitus in North Indian children. *Hum Immunol*. 2004;65:47-53.

- 37-** Dinauer, D.M, Luhm, R.A., Uzgiris, A.J., Eckels, D.D., Hessner, M.J. Sequence-based typing of HLA class II DQB1. *Tissue Antigens*. 2000;55:364-68.
- 38-** Guja, C., Guja, L., Nutland, S., Rance, H., Sebastien, Todd ,J.A., Ionescu-Tirgoviste C. Type 1 diabetes genetic susceptibility encoded by HLA DQB1 genes in Romania. *J Cell Mol Med*. 2004;8(2):249-56.
- 39-** Pugliese A, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus of man: genetic susceptibility and resistance.Oxford Chapter 7. Update 3/2002.
<http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/eisenbook.html>.
- 40-** Khalil, I., Deschamps, I., Lepage, V., Al-Daccak, R., Degos, L., Hors, J. Dose effect of cis- and trans-encoded HLA-DQ heterodimers in IDDM susceptibility. *Diabetes*. 1992;41:378-384.
- 41-** Routsias, J., Papadopoulos, G.K. Polymorphic structural features of modelled HLA-DQ molecules segregate according to susceptibility or resistance to IDDM. *Diabetologia*. 1995;38:1251-61.
- 42-** Jin-Xiong, S. Susceptibility to type 1 diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunology Today*. 1996;17:323-29.
- 43-** Undlien, D.E., Friede, T., Rammensee, H.G., Joner, G., Dahl-Jorgensen, K., Sovik, O. et al. HLA-encoded genetic predisposition in IDDM.DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. *Diabetes*. 1997;46:143-149.
- 44-** Siebold, C., Hansen, B.E., Wyer, J.R., Harlos, K., Esnouf, R.E., Svejgaard, A.,et al. Crystal structure of HLA-DQ0602 that protects against type 1 diabetes and confers strong susceptibility to narcolepsy. *PNAS*. 2004;101(7):1999-2004.
- 45-** Alves, C., Meyer, I., Vieira, N., Toralles, M.B.P., LeMaire, D. Distribuição e frequência de alelos e haplotipos HLA em brasileiros com diabetes melito tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(3):436-44.
- 46-** Fernandes, A.P.M., Maciel, L.M.Z., Foss, M.C., Donadi, E.A. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças autoimunes endócrinas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47/5:601-611.
- 47-** Bell, G.I., Horita, S., Karam, J.H. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 1984;33:176-83.
- 48-** Kelly, M.A, Rayner, M.L., Mijovic, C.H., Barnett, A.H. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol*. 2003;56:1-10.

- 49-** Undlien, D.E., Hamaguchi, K., Kimura, A., Tuomilehto-Wolf, E., Swai, A.B., McLarty, D.G., et al. IDM susceptibility associated with polymorphisms in the insulin gene region. A study of blacks, caucasians and orientals. *Diabetologia*. 1994;37:745-9.
- 50-** Owerbach, D., Gabbay, K.H. Localization of a type 1 diabetes susceptibility locus to the variable tandem repeat region flanking the insulin gene. *Diabetes*. 1993;42:1708-14.
- 51-** Bennett, S.T., Lucassen, A.M., Gough, S.C.L, Powell, E.E., Undlien, D.E., Pritchard, L.E., et al. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet*. 1995;9:284-292.
- 52-** Bennett, S.T., Todd, J.A. Human type 1 diabetes and the insulin gene:principles of mapping polygenes. *Annu Rev Genet*. 1996a;30:343-70.
- 53-** Vafiadis, P., Benkalha, H.O., Palumbo, M., Grabs, R., Rousseau, M., Goodyer, C.G., Polychronakos, C. Class III alleles of the variable number of tandem repeat insulin polymorphism associated with silencing of thymic insulin predispose to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(8):3705-3710.
- 54-** Bennett, S.T., Wilson, A.J., Esposito, L., Bouzekri, N., Undlien, D.E., Cucca, F., et al. Insulin VNTR allele-specific effect in type 1 diabetes depends on identity of untransmitted paternal allele. *Nat Genet*. 1997;17:350-352.
- 55-** Undlien, D.E, Berg, J.O. Common variants in the regulatory region of the insulin gene are associated with fasting plasma insulin levels in juvenile obesity. *Eur J Endocrinol*. 2001;144:457-459.
- 56-** Vafiadis, P., Bennett, S.T., Todd, J.A., Nadeau, J., Grabs, R., Goodyer, C.G et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet*. 1997;15:289-292.
- 57-** Pugliese, A., Zeller, M., Fernandez, J.R.A., Zalcborg, L.J., Bartlett, R.J., Ricord, C., et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet*. 1997;15:293-297.
- 58-** Hanukoglu, A., Mizrachi, A., Dalal, I., Admoni, O., Rakover, Y., Bistrizter, Z., et al. Extraprostatic autoimmune manifestations in type 1 diabetes patients and their first-degree relatives: a multicenter study. *Diabetes Care*. 2003;26:1235-40.
- 59-** Barker, J.M. Clinical review: type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1210-7.

- 60-** Ikegami, H., Awata, T., Kawasaki, E., Kobayashi, T., Maruyama, T., Nakanish, K., et al. The association of CTLA4 polymorphism with type 1 diabetes is concentrated in patients complicated with autoimmune thyroid disease: a multicenter collaborative study in Japan. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(3):1087-92.
- 61-** Redondo, M.J, Eisenbarth, G.S. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes and associated disorders. *Diabetologia.* 2002;45:605-22.
- 62-** Gamberini, M., Correia, M.R.S., Davini, E., Alves, L., Mainardi-Novo, D.T., Miura, I., et al. Associação do polimorfismo + 49 A/G no exon 1 do gene CTLA-4 com diabetes melito tipo 1 e suas apresentações clínicas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50:S180.
- 63-** Hauache, O.M., Reis, A.F., Oliveira, C.S., Vieira, J.G., Sjoroos, M., Ilonen., J. Estimation of diabetes risk in Brazilian population by typing for polymorphisms in HLA-D-DQ, INS and CTLA-4 genes. *Dis Markers.* 2005;2:139-45.
- 64-** Bottini, N., Muscumecci, L., Alonso, A., Rahmouni,S., Nika, K., Rostamkhani, M., et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatasis associated with type I diabetes. *Nat Genet.*2004;36:337-8.
- 65-** Chelala, C., Duchatelet, S., Joffret, M.L., Bergholdt, R., Dubois-Laforgue, D., Ghandil, P., et al. PTPN22 R620W functional variant in type 1 diabetes and autoimmunity related traits. *Diabetes.* 2007;56(2):522-6.
- 66-** Criswell, L.A, Pfeiffer, K.A., Lum, R.F., Gonzales, B. Novitzke, J., Kern, M., et al. Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet.* 2005;76(4):561-71.
- 67-** Gamberini, M., Crisostomo, L.G., Mainardi-Novo D.T., Longhi, M.T., Davini, E., Alves, LI., et al. Genetic Association between the Lymphoid Tyrosine Phosphatase Locus (LYP/PTPN22) with type 1diabetes in caucasians. Program of the 89th Annual Meeting of the Endocrine Society, Toronto, CA, 2007, poster session.
- 68-** Bi, Y., Liu, G., Yang, R. Th17 Cell Induction and Immune Regulatory Effects.*J.Cell Physiol.*2007;211:273-278.
- 69-** Chae, S-C., Li, C-S., Kim, K.M., Yang, J.Y., Zhang, Q., Lee, Y-C., Yang,Y-S., Chung, H-T. Identification of polymorphisms in human interleukin-27 and their association with asthma in a Korean population. The Japan Society of Human Genetics and Springer 2007 February.

- 70-** Dong, C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature Review*. 2006 April; 6:329-333.
- 71-** Afzali, B., Lombardi, G., Lechler, R.I., Lor, G.M. The role of T helper 17(Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp. Immunol.* 2007 Apr; 148(1):32-46.
- 72-** Fu, S., Zhang, N., Yopp, A.C., Chen, D., Măo, M., Chen, D. *et al.* TGF- β induces Foxp3+ T regulatory cells from CD4+CD25) precursors. *Am J Transplant* 2004;4:1614-27.
- 73-** Akbari, O., Stock, P., Meyer, E., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M.J., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2003;9(5):582-8. Epub 2003 Mar 31.
- 74-** Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., Sakaguchi, S. Naturally anergic and suppressive CD25+CD4+ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* 2000;12:1145-55.
- 75-** Quian, Y. *et al.* The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nature Immunology*. 2007 Mar; 8(3): 247-256
- 76-** Steinman, L. A brief history of Th 17, the first major revision in the TH1/TH 2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. 2007 Feb; 13(2): 139-145.
- 77-** Gelfand, E.W. A update on Transcription Factor in Asthma. American Academy of Allergy. Asthma & Immunology 2007 Annual Meeting. Medscape. 2007 Feb
- 78-** Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Harrington, L.E. IL-17 Family cytokines and the Expanding Diversity of Effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 2007;25:821-852.
- 79-** Maitra, A. *et al.* Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *PNAS*. 2007;104(18): 7506-7511.
- 80-** Crisostomo, L.G., Fores, J.P., Silva, M.E.R. - Joint meet -2009 - Hormone Research PO1 – 351 Type 1 Diabetes)
- 81-** Fores, J.P., Santos, A.S., Crisostomo, L.G., Onii, N., Vascocelos, D.M., Silva, M.E.R. Níveis de IL-17 A em pacientes portadores de Diabetes *mellitus* tipo 1 autoimune- 9º congresso paulista de diabetes e metabolismo-Águas de São Pedro-2010 – Pôster nº 20.

- 82-** Trembleau, S., Penna, G., Gregori, S., Chapman, H.D., Serreze, D.V., Magran, J. and Adorini, L.(1999) Pancreas-infiltrating Th1 cells and diabetes develop in IL-12-deficient nonobese diabetic mice. *J.Immunol.*163, 2960-2968.
- 83-** Wang, R., Han, G., Wang, J., Chen, G., Xu, R., Wang, L., Li, X., Shen, B. and Li, Y. The pathogenic role of interleukin-27 in autoimmune diabetes. *Cell. Mol.Life Sci.*65(2008) 3851-3860.
- 84-** Yoshimoto, T., Yasuda, K., Mizuguchi, J. and Nakanishi, K. (2007) IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. *J.Immunol.* 179, 4415-4423.
- 85-** Neufert, C., Becker, C., Wirtz, S. Fantini, M.C., Weigmann, B., Galle, P.R., Neurath, M.F. IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1. *Eur.J.Immunol.*2007 Jul.
- 86-** Goldberg, R., Wildbaum, G., Zohar, Y., Maor, G. and Karin, N. (2004) Suppression of ongoing adjuvant-induced arthritis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27.*J.Immunil.*173,1171-1178.
- 87-** Yoshimura, T., Takeda, A., Hamano, S., Miyazaki, Y., kinjyo, I. Ishibashi, T., Yoshimura, A. e Yoshida, H. Two-Sided Roles of IL-27: Induction of Th1 Differentiation on Naïve CD4+ T Cells versus Supression of Proinflammatory Cytokine Production Including IL-23 – Induced IL-17 on Activated CD4+ T Cells Partially Through STAT3-Dependent Mechanism–*The Journal of Immunology.* 2006
- 88-** Larousserie, F., Charlot, P. Bardel, E., Froger, J., Kastelein, R.A and Devergne, O. Differential Effects of IL-27 on Human B Cell Subsets – *The Journal of Immunology*, 2006, 176:5890-5897.
- 89-** Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Hata, K., Fukai, F., Matsui, M., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. A Role for IL-27 in Early Regulation of Th1 Differentiation- *The Journal of Immunology* , 2005. 175:2191-2200.
- 90-** Hunter, C.A. New IL-12 –Family Members: IL-23 and IL-27, Cytokines with divergent functions. *Nature Reviews Immunology* 2005 July.
- 91-** Fitzgerald, D.C., Cirio, B. , Touil, T., Harle, H., Grammatikopolou, J., Sarma, J.D., Gran, B., Zhang, G.X., Rostami, A. Suppressive Effect of IL-27 on Eccephalitogenic Th17 Cells and the Effector Phase of Experimental Autoimune Encephalomyelitis. *Journal Immunol.*2007 sep.

- 92-** Batten, M., J. Li, S. Yi, N. M. Kljavin, D. M. Danilenko, S. Lucas, J. Lee, F. J. de Sauvage, and N. Ghilardi. 2006. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat. Immunol* 7: 929–936.
- 93-** Stumhofer, J. S., A. Laurence, E. H. Wilson, E. Huang, C. M. Tato, L. M. Johnson, A. V. Villarino, Q. Huang, A. Yoshimura, D. Sehy, et al. 2006. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat. Immunol.* 7: 937–945.
- 94-** Amadi-Obi, A., C. R. Yu, X. Liu, R. M. Mahdi, G. L. Clarke, R. B. Nussenblatt, I. Gery, Y. S. Lee, and C. E. Egwuagu. 2007. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat. Med.* 13:711–718.
- 95-** Villarino, A. V., J. S. Stumhofer, C. J. Saris, R. A. Kastelein, F. J. de Sauvage, and C. A. Hunter. 2006. IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation. *J. Immunol.* 176: 237–247.
- 96-** Ouaked, N., Mantel, Pierre-Yves., Bassin, C., Burgler, S., Siegmund, K., Akdis, C.A., and Weber, C.B.S. Regulation of the foxp3 gene by the Th1 cytokines: The role of IL-27-induced STAT1. *J. Immunol.* 2009;182;1041-1049.
- 97-** Stumhofer, J. S., and C. A. Hunter, C.A. 2008. Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27. *Immunol. Lett.* 117: 123–130.
- 98-** Neufert, C., C. Becker, S. Wirtz, M. C. Fantini, B. Weigmann, P. R. Galle, and M. F. Neurath. 2007. IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1. *Eur. J. Immunol.* 37:1809–1816.
- 99-** Stumhofer, J. S., J. S. Silver, A. Laurence, P. M. Porrett, T. H. Harris, L. A. Turka, M. Ernst, C. J. Saris, J. J. O’Shea, and C. A. Hunter. 2007. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat. Immunol.* 8: 1363–1371.
- 100-** Kalliolias, G. D., and L. B. Ivashkiv. 2008. IL-27 activates human monocytes via STAT1 and suppresses IL-10 production but the inflammatory functions of IL-27 are abrogated by TLRs and p38. *J. Immunol.* 180: 6325–6333.
- 101-** Artis, D., A. Villarino, M. Silverman, W. He, E. M. Thornton, S. Mu, S. Summer, T. M. Covey, E. Huang, H. Yoshida, et al. 2004. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J. Immunol.* 173:5626–5634.

- 102-** Anderson, M. S. and Bluestone, J. A. (2005) The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 447–485.
- 103-** Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal Malefyt, R., Rennick, D., Kastelein, R. A. (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16, 779–790.
- 104-** Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., Kastelein, R. A. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715–725.
- 105-** Yoshida, H., Hamano, S., Senaldi, G., Covey, T., Faggioni, R., Mu, S., Xia, M., Wakeham, A. C., Nishina, H., Potter, J., Saris, C. J., Mak, T. W. (2001) WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to *L. major* infection. *Immunity* 15, 569–578.
- 106-** Chen, Q., Ghilardi, N., Wang, H., Baker, T., Xie, M. H., Gurney, A., Grewal, I. S., de Sauvage, F. J. (2000) Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407, 916–920.
- 107-** Huang, N.; Liu, L., Wang, X-Z., Liu, D., Yin, S-Y., Yang, X-D. Association of interleukin (IL)-12 and IL-27 Gene polymorphisms with Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a Chinese Population. (2008) *DNA and Cell Biology* 27, 527-531.
- 108-** Schmidli, R.S., Colman, P.G., Bonifacio, E. et al. High level of concordance between assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The first international glutamic acid decarboxylase antibody workshop. *Diabetes*. 1994;43:1005-1009.
- 109-** Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E et al. Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The second international GADAb workshop. *Diabetes*. 1995;44:636-640.
- 110-** Goldberg, R., Zohar, Y., Wildbaum, G., Geron, Y., Maor, G. and Karin, N., Suppression of ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by neutralizing the function of the p28 subunit of IL-27. *J. Immunol.* 2004. 173: 6465–6471.

- 111-** Nieuwenhuis, E. E., Neurath, M. F., Corazza, N., Iijima, H., Trgovcich, J., Wirtz, S., Glickman, J. et al., Disruption of T helper 2-immune responses in Epstein-Barr virus-induced gene 3-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002. 99: 16951–16956.
- 112-** Yoshida)Launois, P., Swihart, K. G., Milon, G., Louis, J. A. (1997) Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania major* rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J. Immunol.* 158, 3317–3324.
- 113-** Miyazaki Y, Inoue H, Matsumura M et al (2005) Exacerbation of experimental allergic asthma by augmented Th2 responses in WSX-1-deficient mice. *J Immunol* 175:2401–2407 .
- 114-** Pot, C., Jin, H., Awashi, A., Liu, S-M., Lai, C-Y., Madan, R., Sharpe, A.H., Karp, C.L., Miaw, S-C., Ho, I-C. and Kuchroo, V.K. 2009. IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21 and costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells.
- 115-** Li, C-S., Zhang, Q., Lee, K-J., Cho, S-W., Lee, K-M., Hahm, K-B., Choi, S-C., Yun, K-J., Chung, H-T e Chae and S-C. (2009) Interleukin-27 polymorphisms are associated with inflammatory bowel diseases in a Korean population. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1692-1696
- 116-** Wang, S., Zhu, C., Zhang, R., Liu, L., and Wu, J. Association of interleukin 27 expression and p28 gene polymorphism with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* Vol. 1 (2) pp. 028-033, July, 2009
- 117-** Barret, J.C., Clayton D., Concannon, P., Akolbar, B., Cooper, J.D., Erlich, H.A., Julier, C., Morahan, G., Nerup, J., Nierras, C., Plagnol, V., Pociot, F., Schuikenburg, H., Smyth, D.J. Stevens, H., Todd, J.A., Walker, N.M., Rich, S.S - Type 1 Diabetes Genetics Consortium (2009). Genome-wide association study and meta-analysis finds over 40 loci affect risk of type 1 diabetes.
- 118-** Stephens, M, Smith, N.J. e Donnelly (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from populational data. *Am. J. Hum. Genet.* 68:978-989.
- 119-** Stephens, M, e Donnelly (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction. *Am. J. Hum. Genet.* 73:1162-1169.
- 120-** Clement, M., Posada, D. e Crandall, K. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1660.

- 121-** Templeton, A.R., Crandall, K. A. e Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132:619-633.
- 122-** Mayer, K.D., Mohrs, K., Reiley, W. et al (2008) Cutting edge: T-bet and IL-27R are critical for in vivo IFN-gamma production by CD8 T cells during infection. *J. Immunol* 180:693–697
- 123-** Owaki, T., Asakawa, M., Fukai, F. et al (2006a) IL-27 induces Th1 differentiation via p38 MAPK/T-bet- and intercellular adhesion molecule-1/LFA-1/ERK1/2-dependent pathways. *J Immunol* 177:7579–7587
- 124-** Lucey, D.R., Clerici, M., Shearer, G.M. (1996). Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 9 (4): 532-562.
- 125-** Yanxia, Cao., Paul, D., Doodes., Tibor,T., Glant and Alison Finnegan. IL-27 Induces a Th1 Immune Response and Susceptibility to Experimental Arthritis .
- 126-** Yamanaka, A.S., Hamano, Y., Miyazaki, K., Ishii, A., Takeda, T.W., Mak, K., Himeno,A., Yoshimura, and H.Yoshida. 2004. Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis. *J. Immunol.* 172: 3590–3596.
- 127-** Yoshimoto, T., et al. Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27. *J Immunol* 2004;173:2479–2485.
- 128-** Larousserie, F., Pflanz, S., Coulomb-L'Hermine, A. et al (2004) Expression of IL-27 in human Th1-associated granulomatous diseases. *J Pathol* 202:164–171
- 129-** Kamiya, S., Owaki, T., Morishima, N. et al (2004) An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells. *J Immunol* 173:3871–3877.
- 130-** Rosas, L.E., Satoskar, A.A., Roth, K.M. et al (2006) Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice display enhanced resistance to leishmania donovani infection but develop severe liver immunopathology. *Am J Pathol* 168:158–169.
- 131-** Graber, J., Allie, S., Mullen, K. et al (2008) Interleukin-17 in transverse myelitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 196:124–132 .

- 132-** Shahrara, S., Huang, Q., Mandelin, A. et al (2008) Th-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10:R93.
- 133-** Yang, J., Yang, M., Htut, T.M. et al (2008) Epstein-Barr virus-induced gene 3 negatively regulates IL-17, IL-22 and ROR γ expression. *Eur J Immunol* 38:1204–1214.
- 134-** Diveu, C., McGeachy, M., Boniface, K. et al (2009) IL-27 blocks ROR γ expression to inhibit lineage commitment of Th17 Cells. *J Immunol* 182:5748–5756.
- 135-** Greenwell-Wild, T., Vazquez, N., Jin, W. et al (2009) IL-27 inhibition of HIV-1 involves an intermediate induction of type I interferon. *Blood* 114:1864–1874.
- 136-** Prasad, M.V., Reddy, Linga, Wang, H., Liu, S., Bode, B., Reed, J.C., Steed, R.D., Anderson, S.W., Steed, L., Hopkins, D. and She, J-X. (2011) Association between type 1 diabetes and GWAS SNPs in the southeast US Caucasian population.