JÉSSICA PEREIRA FORES

**Impacto da IL-17A na predisposição ao
diabetes mellitus tipo 1A**

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

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Fores, Jéssica Pereira

Impacto da IL-17A na predisposição ao diabetes mellitus tipo 1 autoimune /
Jéssica Pereira Fores. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Maria Elizabeth Rossi da Silva.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1 2.Interleucina-17 3.Polimorfismo
(Genética) 4.Receptores de interleucina 17 5.Linfócitos T 6.Autoanticorpos

USP/FM/DBD-448/10

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio LIM 18 da Disciplina de Endocrinologia Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com a colaboração do Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências – LIM 56. Este trabalho contou com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): 2008/04472-6 e bolsa de Mestrado Capes.

Dedicatória

Aos meus pais, que me deram a vida e se doaram integralmente a minha criação.
Acreditaram nos meus sonhos e apostaram neles como se fossem seus.
Eu devo tudo a vocês.

Agradecimentos

Agradeço com muito carinho a minha orientadora Maria Elizabeth Rossi da Silva, pela oportunidade de realizar este trabalho no LIM-18, por todas as oportunidades e experiências que vivi durante estes 3 anos. Levo um saldo muito positivo: amadureci, aprendi muito, fui colocada à prova diversas vezes e sei que só passei por isso porque você acreditou em mim. E agradeço pela amizade que fica e levo para sempre no meu coração.

Agradeço a Dra Dalva Marreiro Rocha pelas palavras de apoio, por sempre ter algo bom a dizer e por ser um exemplo de profissional e pessoa. E a Dra Rosa Santos pelo interesse, atenção e excelentes sugestões para a realização deste trabalho.

Agradeço a Rosinha Fukui por dar o exemplo de como ser uma boa profissional, por ser uma das pessoas mais empenhadas em fazer ciência, dedicada, por me ajudar muito tanto em conceito como na parte prática.

Agradeço a Aritânia, por ter sido a pessoa que mais ficou ao meu lado durante esses 3 anos. Agradeço por você ter dividido o seu dia a dia comigo, dividido bancada, pelas conversas, por me ouvir nos meus desabaços, me entender, por me ensinar muita Biologia Molecular, pelo seu empenho em me ajudar a realizar este trabalho e por sua amizade que ultrapassou as barreiras do laboratório e por nossas aventuras nos EUA.

Agradeço as meninas do LIM-18: Adriana, Greci, Fernanda e Fátima por me agüentarem no LIM, por serem ótimas companheiras de almoço, pelas conversas e risadas que demos juntas.

Aos colegas de pós graduação que se tornaram amigos Lindiane, Débora, Teresa, Kátia, Vinicius pelo convívio diário, por serem meus parceiros na realização deste trabalho. Dividimos bancada, coletas, conceitos, viagens, congressos. Aprendi, e me diverti muito com vocês. A Maysa e Mari pelas conversas e interesse demonstrado em todos os momentos.

A “Riqueza”, 1ª amiga de pós graduação, que passou por praticamente tudo que eu passei, que me entende como ninguém, que faz muita falta no meu dia a dia Renata você é minha “não médica” preferida, foi uma pessoa emocionalmente fundamental neste processo. Deu os melhores conselhos, dividiu sua vida comigo, vibrou com cada conquista.

A uma pessoa especial recém chegada no LIM: Maria Edna de Melo por ter acreditado em mim. Por ter me ajudado a resolver inúmeros problemas, dispondo por muitas vezes do seu tempo só para me ajudar.

Não posso deixar de agradecer a pessoa que é meu exemplo de Bióloga, Emilia Modolo Pinto quem ajudou tanto aqui no Brasil como nos EUA, obrigada por tudo, por acreditar em mim, por ter me adotado, por desejar que este trabalho desse certo, pelas caronas para casa, pela preocupação comigo mesmo distante. Você deixou muitas saudades nesse período longe, mas sei que vai voltar logo para continuarmos a dar muitas risadas juntas.

Enfim a toda equipe do LIM18 por esses 3 anos de trabalho foi um prazer conhecer pessoas tão diferentes e que de alguma forma fizeram parte da minha historia.

Ao Dewton Moraes Vasconcelos por sempre estar disposto e interessado em me ajudar e por ter abraçado esse trabalho como seu também. E obrigada por ter disponibilizado seu laboratório, assim como a Noêmia pela realização de grande parte deste trabalho.

A Professora Myrthes Toledo Barros por ter divido a experiência do PAE comigo, por me ajudar a entender este mundo acadêmico da Graduação.

A Maria Aparecida Basile por ser exemplo de profissional empenhada fazer a diferença a partir da Educação. Obrigada por ter me dado esta oportunidade de ser sua aluna, tenho orgulho em dizer a todos que passei por sua sala de aula. E que aproveitei como ninguém cada segundo. Você foi a pessoa que mais exigiu de mim, tive que amadurecer muito em pouco tempo, vencer os maiores desafios, o que você fez por mim e proporcionou não tem preço.

As minhas Pipocas: Patricia, Mavi, Viviane e Natalia por serem o melhor grupo interdisciplinar da FMUSP, pela vibração de cada desafio vencido, pelas críticas que me ajudaram a crescer, por estarem ao meu lado no momento mais importante para mim. “Uma vez Pipoca nunca mais piruá”.

Aos meus “não acadêmicos” começando pela minha mãe que é a pessoa que me deu a vida, que acreditou em mim mais do que eu mesma, por se empenhar física e mentalmente em mim, por sofrer comigo e não me deixar cair, por ser minha companheira, minha amiga. Eu sei que todo mundo diz isso, mas a melhor mãe do mundo é a minha!

Ao meu pai por ser esse super pai, extremamente presente, por ser meu melhor ouvinte, pelo orgulho imenso que sente por mim, por ser este amigo que você é. Por ser também o meu exemplo e o melhor espanhol que alguém pode ter. Pai e Mãe vocês são a minha vida!

A minha metade, o meu melhor amigo, quem segurou as pontas, quem não me deixou desistir, meu namorado Raphael. Por significar muito mais do que esta palavra namorado quer dizer, praticamente você defende uma dissertação de mestrado comigo. Obrigada por extrair o melhor de mim sempre, por acreditar e por sempre estar ao meu lado.

A minha sogra Elaine, por ser o inverso de todos os perfis de sogra, por acreditar em mim, por ter sido a minha 1ª banca, por me apoiar, ser minha amiga e ao lado do meu sogro Douglas me ajudar a realizar este sonho. Ao meu cunhado Guilherme por vibrar com cada congresso, cada aula, cada etapa vencida. Vocês são minha segunda família

As minhas Biólogas: Débora, Natalia e Thalita por terem sido o melhor presente de faculdade. E minha “amiga-irmã” de sempre Carol por acreditar em mim como profissional, fazer propaganda da sua amiga bióloga mestranda em cada lugar que você vai. Enfim, as vocês 4 por entenderem essa fase da minha vida, minha ausência e mesmo assim estarem sempre ao meu lado.

Vocês são meus amores, minhas amoras!

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Resumo

Summary

Introdução	31
1- Genética do DM1A	32
2- Autoimunidade no Diabetes Mellitus tipo 1	35
3- Vias de ativação do sistema imune	37
4- Família da Interleucina 17	42
5- Diferenciação da via Th17	43
6- Relação entre células Th17, doenças inflamatórias e autoimunidade	46
Justificativa para o estudo da IL-17 ^a	48
Objetivos	50
Métodos	52
1- Considerações éticas	53
2- Casuística	53
2.1 – Pacientes	53
2.2 – Controles	54
3 – Avaliação Bioquímica:	55
3.1 – Glicemia	55
3.2 – Hemoglobina Glicada	55
3.3 - Auto-anticorpos pancreáticos: Anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e Anti-proteína homóloga à tirosino-fosfatase (anti-IA2)	56
4 – Estudo Molecular	56
4.1 – Genotipagem do Sistema HLA	57
4.1.1 – Genotipagem dos Alelos HLA-DR	57
4.2 – Amplificação das regiões selecionadas do gene da IL-17A	58
4.2.1 – Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	58
4.2.2 – Sequenciamento automático:	61
5 – Determinação dos níveis séricos de IL-17	62
6 – Citometria de fluxo	62
6.1 – Estudo da expressão do receptor da IL-17A por citometria de fluxo	63
7 – Análise estatística	65
8 – Estratégia do estudo	65

Resultados	67
1- Achados Clínicos	68
2- Achados Moleculares	69
2.1- Gene da IL-17 ^a	69
2.2 – Sistema HLA	77
3 – Análise da IL-17 sérica e expressão do receptor da IL-17A	77
3.1 – Resultados dosagem de IL-17A sérica	78
3.2 – Expressão do receptor da IL-17RA	78
3.2.2 – Resultados da Citometria de Fluxo	81
4 – Correlação entre valores de expressão de IL-17RA e valores metabólicos	82
Discussão	90
Conclusões	92
Anexos	131
Referências Bibliográficas	116

Lista de Abreviaturas

APC	célula apresentadora de antígeno
AR	artrite reumatóide
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CTLA8	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 8</i>
DM1A	Diabetes mellitus tipo 1A
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
ECD	Ficoeritrina <i>Texas Red</i>
EAE	Encefalite experimental autoimune
FITC	Isotiocinato de flurosceína
FOX p3	<i>forkhead Box P3</i>
HLA	Antígeno leucocitário humano
I125	Iodo 125
IDDM1	<i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 1</i>
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-17	Interleucina 17, Interleucina 17A
IL-17RA	Receptor da interleucina 17
INS	Gene da Insulina
MFI	Intencidade média de fluorescência
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
PC5	Ficoeritrina –cianina 5
PCR	reação em cadeia de polimerase
PE	Ficoeritrina
NKT	células T <i>natural killer</i>
NOD	Camundongo não obeso diabético
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RR	Risco Relativo
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> enzima polimerase
TGF- β	fator transformador de crescimento β
TNF α	fator de necrose tumoral
Th	T helper

Treg	células T regulatórias
STAT-3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
ROR γ t	receptor nuclear órfão relacionado ao ácido retinóico
STAT-3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
VNTR	número variável de seqüências repetidas

Lista de Símbolos

β	beta
α	alfa
γ	gama
=	igual
>	maior
<	menor
$\leq$	menor igual
$\pm$	mais ou menos
%	percentagem
N	número
μL	microlitro
mL	mililitro
ng	nanograma
ng/ μL	nanograma/microlitro
mg/dL	miligramas/decilitro
mg/mL	miligramas/mililitro
U/ μL	unidade/microlitro
U/mL	unidade/mililitro
nU/mL	nanounidades/mililitro
M	molar
mM	milimol
pMol	picomol

MgCl₂ Cloreto de magnésio

Na Sódio

I¹²⁵ iodo 125

KDa kilodaltons

°C grau Celsius

Lista de Figuras

- Figura 1:** Desenvolvimento funcional e ativação de subpopulações de células T. Citocinas produzidas por linfócitos TCD4+ efetores são cruciais para determinar a eliminação de patógenos. A Interleucina (IL)-12 promove direcionamento para via Th1, caracterizada pela produção de Interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Células Th2 são promovidas pela IL-4. Desenvolvimento dos fenótipos Treg e Th17 requerem, para ambos, a presença do fator transformador de crescimento β . Este, na presença preferencial de IL-6, direciona para o fenótipo Th17. Células Tregs expressam Foxp3 e são estimuladas por TGF- β . 40
- Figura 2:** Diferenciação das células Th17 em camundongos e em humanos: (A) Em camundongos, as células T virgens ativadas em presença de fator transformador de crescimento β (TGF- β) e Interleucina (IL)-6 iniciam a sua diferenciação. A IL-6 aumenta a expressão de IL-21 e do receptor (IL-23R), favorecendo o desenvolvimento das células Th17. Na ausência de IL-6, o TGF- β induz a diferenciação de células T reguladoras. (B) Em humanos a IL-23, ou a IL-1 dirigem a diferenciação das células Th17. O efeito de IL-1 é intensificado pela IL-23 e/ou IL-6. Citocinas das células Th1 inibem o desenvolvimento de células Th17 que expressam IL-23R. 45
- Figura 3:** Foto do gel de Agarose a 2%, demonstrando o tamanho dos fragmentos amplificados pela PCR do gene da IL-17A, segundo os pares de oligonucleotídeos selecionados. 60
- Figura 4:** Fluxograma esquemático da estratégia do estudo. 66
- Figura 5:** Localização da variante alélica não descrita no gene da IL-17A no exon 3 na posição: c.*911T>C 70
- Figura 6:** Eletroesferograma parcial do gene da IL-17A. Painel A: um paciente com DM1A sem a variante. Painel B: um paciente com DM1A com a nova variante alélica. As setas indicam a localização da variante. 70
- Figura 7:** Localização da variante alélica não descrita no gene da IL-17A no exon3 na posição: c.*1116C>T 70
- Figura 8:** Eletroesferograma parcial do gene da IL-17A. Painel A: um paciente com DM1A sem a variante. Painel B: um controle com a nova variante alélica. As setas indicam a localização da variante. 71
- Figura 9:** Localização da variante alélica não descrita no gene da IL-17A no exon 3 na posição: c.*1184G>C 71
- Figura 10:** Eletroesferograma parcial do gene da IL-17A. Painel A: um paciente com DM1A sem a variante. Painel B: um controle normal com a nova variante alélica. As setas indicam a localização da variante. 71
- Figura 11:** Expressão do receptor da interleucina 17A(IL-17RA) em linfócitos T CD3+ periféricos em pacientes DM1A e controles 80
- Figura 12:** Expressão do receptor da Interleucina-17 em linfócitos T CD4+ periféricos em pacientes DM1A e controles 80

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Pares de iniciadores utilizados na reação em cadeia de polimerase (PCR) e suas respectivas temperaturas de “annealing” dos iniciadores e do tamanho dos fragmentos obtidos após amplificação.	58
Tabela 2 - Reação de amplificação do DNA (PCR)	60
Tabela 3: Características dos pacientes com diabetes mellitus tipo 1A (DM1A) e controles normais.	68
Tabela 4: Valores laboratoriais de pacientes com DM1A e indivíduos controles.	69
Tabela 5: Frequência genotípica dos polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais.	72
Tabela 6: Frequência genotípica das variantes alélicas gene da IL-17A, segundo presença de anticorpo anti-GAD65 em pacientes com DM1A.	73
Tabela 7: Frequência genotípica dos polimorfismos no gene da IL-17A, segundo presença de anticorpo anti-IA2 em pacientes com DM1A.	74
Tabela 8: Frequência genotípica das variantes alélicas no gene da IL-17A em pacientes com DM1A segundo etnia.	75
Tabela 9: Frequência genotípica das variantes alélicas no gene da IL-17A em pacientes com DM1A segundo sexo.	76
Tabela 10: Frequência dos genótipos HLA-DRB1 em pacientes com DM1A e controles normais.	77
Tabela 11: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com DM1A recente e controles normais.	78
Tabela 12: Identificação dos linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+.	79
Tabela 13: Expressão do IL-17RA em linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+.	79
Tabela 14: Intensidade média de Fluorescência (MFI) para o receptor da IL- 17A em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles.	81

Lista de Anexos

ANEXO 1: Aprovação da Comissão de Ética – CAPPesq para o referido Trabalho	93
ANEXO 2: Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos pacientes (ou responsáveis) com DM1A e controles	94
ANEXO 3: Dados laboratoriais dos pacientes diabéticos. AC Anti GAD65 expresso em Ui/ml (normal até 0,8). anti-IA2 expresso em Ui/ml (normal até 0,5). Glicemia em mg/dl e Hba1C em %.	99
ANEXO 4: Dados laboratoriais dos controles. AC Anti GAD65 expresso em Ui/ml (normal até 0,8). anti-IA2 expresso em Ui/ml (normal até 0,5). Glicemia em mg/dl e Hba1C em %.	102
ANEXO 5: Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte1).	105
ANEXO 6: Valores de IL-17 sérica em pacientes com DM1A e controles, foram considerado dosáveis acima de 15pg/ml.	123
ANEXO 7: Expressão (%) do receptor da IL-17 (IL-17RA) em paciente com DM1A e indivíduos controles obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam IL-17RA)	125
ANEXO 8: Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da interleucina 17 em linfócitos T periféricos de pacientes com DM1A e controles	126
ANEXO 9: Correlação entre valores metabólicos (glicemia, HbA1c, anti-GAD65 e anti-IA2) e células T regulatórias com expressão do receptor da IL-17A em pacientes com DM1A	127

Resumo

Fores J.P. *Impacto da IL-17A na predisposição ao diabetes mellitus tipo 1 autoimune* [dissertação]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010 117p.

Diabetes Mellitus tipo 1A (DM1A), doença autoimune clássica, decorrente da quebra de tolerância imune por fatores ambientais em indivíduos geneticamente predispostos, é caracterizada pela infiltração pancreática de linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas. As células T auxiliaadoras 17 (Th17) são células potentes, altamente inflamatórias, que produzem a interleucina 17A (IL-17A), citocina mediadora de várias desordens imunológicas como, artrite reumatóide, esclerose múltipla, encefalite experimental autoimune, psoríase e asma, e em animais, o diabetes autoimune. No entanto, seu papel na patogênese do DM1A em humanos não está definido. O objetivo de nosso estudo foi avaliar a influência da IL-17A na predisposição ao DM1A através da identificação de variantes alélicas no gene da IL-17A (por sequenciamento automático) e da determinação dos níveis séricos de IL-17A (por ELISA) e da expressão do seu receptor em linfócitos T periféricos (por citometria de fluxo). Foram analisados 103 pacientes com DM1A (idade $15,15 \pm 10,38$) e 102 controles normais (idade $18,29 \pm 10,83$). O estudo da expressão do receptor da IL-17A em linfócitos T periféricos bem como o da proteína sérica foram conduzidos em 24 pacientes com DM1A recente (duração inferior a 6 meses) e 23 controles normais. Resultados: Nos 3 exons da IL-17 A analisados, a frequência das 14 variantes alélicas já descritas em bancos de dados e de três novas variantes alélicas na região não codificadora do exon 3 (3'UTR) não diferiu entre diabéticos e controles. Detectamos, pela primeira vez, diminuição estatisticamente significativa da expressão proporcional do receptor de IL-17A em células TCD3+ ($p = 0,041$) e TCD4+ ($p = 0,0019$) periféricas de pacientes com DM1A de início recente quando comparados com controles normais. As concentrações séricas de IL-17A foram menores nos diabéticos. Não observamos correlação entre a expressão dos receptores com a resposta humoral (níveis de autoanticorpos pancreáticos anti-GAD65 e anti-IA2) ou com variáveis metabólicas (glicemia e HbA1c). Nossos resultados sugerem que

mutações ou polimorfismos no gene da IL-17A não estão implicadas na predisposição ao DM1A em humanos. A reduzida expressão dos receptores de IL-17A em linfócitos T CD3+ e CD4+ periféricos e das concentrações séricas de IL-17A nos pacientes diabéticos não indicam a participação ativa da via Th17 na periferia na patogênese do DM1A em humanos. No entanto, não descartamos a possibilidade de que, ao estudarmos variáveis na periferia e não do local de agressão imune (as ilhotas pancreáticas), tenhamos obtido valores que não expressem o processo adequadamente. Um eventual mecanismo de regulação negativa da via Th17, na tentativa de proteção do organismo contra o processo inflamatório autoimune, poderia explicar a diminuição de expressão de IL-17RA nos linfócitos periféricos.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1 2.Interleucina-17 3.Polimorfismo (Genética) 4.Receptores de interleucina 17 5.Linfócitos T 6.Autoanticorpos

Summary

Fores, J.P. Impact of IL-17A in the predisposition to type 1 autoimmune diabetes mellitus [dissertation]. São Paulo. "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2010 117p.

Type 1A diabetes mellitus (T1AD), a classical autoimmune disease related to the loss of immune tolerance is determined by environmental factors in genetically predisposed individuals. Pancreatic infiltration of T and B lymphocytes, macrophages and dendritic cells characterize the process. T helper 17 (Th17) cells are potent, highly inflammatory cells, which initiate tissue inflammation and induce infiltration of other inflammatory cells in target organs. They produce the Interleukin 17A (IL-17A), considered a mediator of various immune disorders such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalitis, psoriasis and asthma, and in animals, autoimmune diabetes. However, its role in T1AD pathogenesis in humans is not defined. The aim of our study was to evaluate the influence of IL-17A in T1AD predisposition in humans. The allelic variants of IL-17A gene (by automatic sequencing), the expression of IL-17A receptors in peripheral lymphocytes (by flow cytometry assay) and the serum levels of IL-17A (by ELISA) were analyzed. Our casuistic was composed of 103 patients with T1D ($15,15 \pm 10,38$ years) and 102 normal controls ($18,29 \pm 10,83$ years). The expression of IL-17A receptor in peripheral lymphocytes and the serum concentration of IL-17A were determined in a subgroup of 24 recent-onset T1D (less than 6 months) and 23 normal controls. Results: The frequency of the 14 allelic variants on the 3 exons of IL-17A gene already described on data bases did not differ between patients with diabetes and controls. We detected three new allelic variants at the final non-coding region of exon 3. Their frequency was also similar between patients and controls. We detected for the first time a statistically significant decrease in the proportional expression of the receptor of IL-17 on CD3+ ($p=0,041$) and CD4+ ($p=0,0019$) T lymphocytes in patients with recent-onset type 1A diabetes. IL-17A serum concentrations were also lower in patients. There was no correlation between the expression of IL-17A receptor and titles of pancreatic autoantibodies (anti-GAD65 or anti-IA2) or metabolic variables (glucose and HbA1c levels). Our results suggest that mutations or polymorphisms of IL-17A

gene are not implicated in the pathogenesis of T1AD in humans. The reduced expression of IL-17A receptors in peripheral T lymphocytes and of IL-17A serum concentrations in patients with diabetes did not indicate a role of Th17 via at the periphery in the autoimmune process. There is however the possibility that by studying the peripheral and not the local immune aggression (pancreatic islets) we have obtained values that do not adequately express the process. A possible mechanism of negative regulation of receptors in an attempt to protect the organism against autoimmune inflammatory process could explain the decrease of IL-17A levels and of IL-17RA expression in peripheral lymphocytes.

Descriptors: 1.Diabetes mellitus 2.Interleukin-17 3.Polimorphism (Genetic)
4. Interleukin 17 receptors 5.T lymphocyte 6.Autoantibodies.

O Diabetes Mellitus tipo 1 autoimune (DM1A) é decorrente da destruição autoimune das células beta do pâncreas, caracterizada pela infiltração pancreática por linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas. O grau de destruição celular é variável. É rápido e intenso em crianças e adolescentes, resultando em necessidade precoce e permanente do tratamento com insulina e risco de cetoacidose, ou é de instalação mais lenta, em adultos, que podem reter certa função residual das células beta por até alguns anos após o diagnóstico. É uma das doenças crônicas mais comuns e graves da infância e da adolescência, sendo caracterizada pela presença de auto-anticorpos contra antígenos pancreáticos^{1, 2}.

Indivíduos com risco de desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 1 A podem ser identificados pela evidencia sorológica do processo autoimune que ocorre nas ilhotas pancreáticas e também por marcadores genéticos.

1- Genética do DM1A

A etiologia do Diabetes Mellitus tipo 1 A é complexa, envolvendo fatores genéticos e ambientais, sendo o componente genético, poligênico. Várias regiões cromossômicas foram identificadas e associadas ao DM1A¹ e regulam tanto suscetibilidade como proteção para a doença.

O principal determinante genético de suscetibilidade para o diabetes está no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), que constitui o mais importante *locus* de suscetibilidade para DM1A, denominado IDDM 1 (*Insulin-Dependent Diabetes Mellitus* 1) – confere 40% a 50% de risco genético

para DM1A está localizado nesta região que contempla os genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) ³. Os genes HLA – A, B e C codificam as moléculas MHC classe I, enquanto as moléculas de classe II (fortemente associadas ao DM1A), são codificadas pelos genes HLA- DR, DQ e DP ⁴. Estas, expressas nas células do sistema imune que incluem monócitos/macrófagos, células dendríticas, epiteliais tímicas, linfócitos B e linfócitos T ativados, atuam no processamento e na apresentação de proteínas extracelulares ².

No *locus* HLA-DR, os alelos -DR*03 ou - DR*04 são os mais freqüentes nos pacientes diabéticos (95% versus 50% dos controles caucasianos). Considerando-se que 30% a 40% desses pacientes, principalmente as crianças, são heterozigotos HLA-DR*03/DR*04 (versus 2% a 3% dos controles), esse genótipo confere o maior risco para a doença, seguido pela homozigose para -DR*04 e, finalmente, para -DR*03 ². Os alelos DRB1*0405 e *0401 são de predisposição, os *0402 e *0404 são neutros e os *0403, *0406 e *0407 são protetores⁴.

Quanto ao *locus* HLA-DQ, em caucasianos, os alelos -DQA1*0301, - DQB1*0302 e -DQA1*0501, -DQB1*0201 são os mais importantes na suscetibilidade ao diabetes autoimune e encontram-se em desequilíbrio de ligação com os alelos HLA-DR*04 e -DR*03, respectivamente, os quais influenciam no risco determinado por aqueles alelos ².

Por outro lado, alguns haplótipos são protetores para DM1A, particularmente HLA-DRB1*1501/DQA1*0102-DQB1*0602 (DR2-DQ6), sendo o alelo *0602, o principal responsável pela proteção ³.

Nos pacientes com DM1A no Hospital das Clínicas da FMUSP (São Paulo), Davini et al, em 2005.⁵ observaram 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, respectivamente. Alves et al, em 2006, analisaram cinco outros estudos sobre alelos e haplótipos HLA no Brasil, confirmando a maior suscetibilidade 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^{2,5}

O segundo maior *locus* de susceptibilidade para o DM1A, denominado IDDM2, situa-se na região 5' do gene da insulina (INS), no cromossomo 11p15, em uma região de 4,1 kb que abrange o gene da insulina, o da tirosina hidroxilase, o do fator de crescimento insulina-símile IGF-2⁶ e contribui com 10% da suscetibilidade genética para a doença². Trata-se de uma região polimórfica, que delineia número variável de seqüências repetidas (VNTR), 5' do gene da insulina. A forma curta do VNTR é associada à susceptibilidade para o diabetes³. Para Davini; et al, em 2005,⁵ (FMUSP – 187 diabéticos e 195 controles), o genótipo INS VNTR I/I (avaliado pelo polimorfismo INS – 23 A/T) prevaleceu nos pacientes diabéticos (60,4%) em relação à população controle (27,2%), conferindo risco relativo para DM1A de 2,2².

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, mas a associação foi confirmada para o gene CTLA-4 (*locus* IDDM12)

² Inúmeros polimorfismos do gene CTLA4 têm sido associados ao DM1A, mas com resultados conflitantes, em pequenos números amostrais. Recentemente, Gamberini et al, em 2006 ⁸, em estudo preliminar com pacientes do HCFMSUP, não verificaram associação de dois polimorfismos: A49G e -318C/T (no exon 1 -região promotora) com DM1, em 279 pacientes e 151 controles normais ^{2,8}.

Paralelamente, genes que codificam outros componentes da resposta imune, como as citocinas, também são fortes candidatos para a susceptibilidade à autoimunidade ⁷.

2 Autoimunidade no Diabetes Mellitus tipo 1

As moléculas HLA classe II, de suscetibilidade e proteção, ligam-se a diferentes epítopos dos antígenos e apresentam peptídeos distintos aos linfócitos T, estimulando ou inibindo a autoimunidade. Paralelamente, moléculas de proteção poderiam também agir via estímulo da resposta imune reguladora ³.

Inúmeras evidências corroboram a natureza autoimune do diabetes mellitus tipo 1A: a presença de infiltrado mononuclear dentro e ao redor das ilhotas (insulite); a presença de marcadores de autoimunidade humorais e celulares contra as células beta; a associação do DM1A com outras doenças autoimunes; a associação com determinados haplótipos do sistema HLA ⁹.

Autoanticorpos, que aparecem em paralelo com o desenvolvimento da doença, relacionam-se à menor produção de insulina e podem estar presentes anos antes do diagnóstico do diabetes ¹⁰. Entretanto, nem todos os indivíduos portadores dos autoanticorpos desenvolvem diabetes plenamente manifesto, o que indica que a insulite, embora seja um pré-requisito, nem sempre é progressiva. Além disso, questionam-se se os autoanticorpos pancreáticos têm participação direta na morte das células beta: o processo destrutivo é mediado principalmente pela infiltração de linfócitos T CD4+ e CD8+ auto-reativos¹¹.

Marcadores humorais contra a insulina (IAA) são usualmente os primeiros a serem observados, especialmente em crianças e jovens. Outros autoanticorpos como o anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático (ICA), anti-enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e anti-proteína de membrana com homologia às tirosinofosfatases ou anti-antígeno 2 do insulinoma (anti-IA2), também são utilizados no diagnóstico da doença. Geralmente, pelo menos um desses marcadores está presente em 85-90% dos indivíduos com hiperglicemia no início da doença ¹²

Anti-GAD65 é freqüentemente associado a outras doenças autoimunes além do diabetes, e sua presença não necessariamente implica progressão para doença². Mantém sensibilidade de 70% a 80% para o diagnóstico de diabetes autoimune e predomina nos portadores de HLA DR3-DQ2 ¹².

O anticorpo anti-IA2 é mais comum entre indivíduos jovens (até 15 anos de idade) e indica rápida progressão para o diabetes manifesto. Diferentes isoformas do IA-2 no timo e no baço, comparadas à do pâncreas, podem induzir auto-imunidade à sequência IA-2 não-presente nos tecidos linfóides ².

Os autoanticorpos, em altos títulos ao diagnóstico, tendem a desaparecer com o tempo, à exceção do anti-GAD65. Davini et AL, em 2005 ⁵, observaram altos títulos e maior frequência de auto-anticorpos (2-3 autoanticorpos positivos) nos primeiros cinco anos do diagnóstico. Já os títulos de anti-GAD65 se mantiveram mais constantes com a progressão da doença. Anti-IA2 predominou nos portadores dos alelos DRB1*04 e DQB1*0302 ⁵.

Como o ICA é um anticorpo que não é dirigido contra um antígeno específico das células beta e sua determinação é pouco reprodutível, e o IAA é encontrado no soro de pacientes que utilizam insulina, estes marcadores são pouco utilizados. Os marcadores mais indicados no diagnóstico do DM1A são o anti-GAD65 e o anti-IA2, que também conferem grande susceptibilidade ao desenvolvimento do DM1A ² em familiares dos pacientes, auxiliando no seu diagnóstico precoce, antes da manifestação clínica.

3 – Vias de ativação do sistema imune

Progresso considerável ocorreu no entendimento da patogênese das doenças autoimunes. A perda de tolerância central e/ou periférica constitui ponto crítico na gênese da autoimunidade ¹³. Na tolerância central, as células T autoreativas são destruídas no timo através via apoptose. Em camundongos diabéticos não obesos NOD (modelo animal para o DM1A), observou-se que as células T autoreativas são resistentes à apoptose central, predispondo ao surgimento da doença autoimune ¹⁴. Sugere-se que esta resistência central à apoptose das células T autoreativas contribua para o desenvolvimento do DM1A em humanos ¹⁵.

O processo de tolerância periférica, é condicionado à ação das células T regulatórias (Treg), que controlam desenvolvimento, o tráfego e a proliferação das células T efetoras. As células Treg são principalmente as células T CD4+ que apresentam alta expressão da molécula de superfície CD25 (cadeia alfa do receptor da interleucina 2) e elevados níveis de FoxP3 (*forkhead Box P3*), fator de transcrição intracelular envolvido na função regulatória. Estudos demonstraram que o nível de apoptose das células Treg é significativamente aumentado nos 6 primeiros meses do diagnóstico de DM1A em humanos, voltando a valores normais após esse período¹⁶. Com isso, aventa-se a possibilidade que quantidades diminuídas de células Treg exerçam papel fundamental na gênese do DM1A¹⁶.

O desenvolvimento e manutenção (homeostase de células T) apropriados dos números e funções das células T são essenciais para a integridade do sistema imune¹⁷. Os progenitores das células T, provenientes da medula óssea, inicialmente migram para o timo, onde sofrem vários processos de seleção e apoptose, sendo então exportados para a periferia como células T maduras, porém *naïve*. Quando as células T *naïve* encontram um antígeno apropriado (apresentado pelas células apresentadoras de antígenos) elas proliferam e se diferenciam em linfócitos T efetores. Esses efetores podem ser os linfócitos T *helper*, que orquestram a resposta imune por ativarem outras células imunológicas, ou linfócitos T citotóxicos, que são as células responsáveis pela erradicação de células alvo. Após a erradicação da fonte de antígenos, a maioria das células T efetoras sofre apoptose, porém uma pequena parte destas células é mantida e se tornam as células de memória¹⁶. Proteínas de membrana podem ser utilizadas como marcadores para se

distinguir funcionalmente as diferentes subpopulações de linfócitos T. A proteína de superfície CD3 caracteriza a subpopulação de linfócitos T, servindo para distingui-los dos linfócitos B e outras células imunológicas ¹⁸.

Doenças autoimunes como o DM1A envolvem a interação de diferentes subconjuntos de linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APC). Linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B (células B), macrófagos e células dendríticas, juntos, desempenham um papel importante na geração da resposta autoimune. Em humanos, o processo que conduz ao DM1A pode ter duração de meses ou anos. Em modelos animais, como nos NOD, há uma infiltração gradual das ilhotas pancreáticas β -células ao longo de semanas.

Linfócitos T CD4+ participam do importante processo de iniciação da resposta imune ^{19, 20} e ganham várias funções durante este processo ²¹. A partir de estímulos do ambiente e de diversas citocinas, as células T CD4+ proliferam e diferenciam-se em subconjuntos de células efetoras, que se caracterizam por diferentes perfis de produção de citocinas, tais como as células T helper 1 (Th1) e Th2, definidas por Mosmann e Coffman (Figura1) ^{20,21}

Figura 1: Desenvolvimento funcional e ativação de subpopulações de células T. Citocinas produzidas por linfócitos TCD4+ efetores são cruciais para determinar a eliminação de patógenos. A Interleucina (IL)-12 promove direcionamento para via Th1, caracterizada pela produção de Interferon gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α). Células Th2 são promovidas pela IL-4. Desenvolvimento dos fenótipos Treg e Th17 requerem, para ambos, a presença do fator transformador de crescimento β. Este, na presença preferencial de IL-6, direciona para o fenótipo Th17. Células Tregs expressam Foxp3 e são estimuladas por TGF-β^{23,24}.

Frente à estimulação por antígenos, os sinais provenientes dos receptores de células T (TCR) serão fundamentais na ativação e indução de fatores de transcrição, que vão diferenciar a resposta imune.

Após o estímulo pela IL-12, produzida pela ativação das APCs, a diferenciação das células Th1 é iniciada e mantida²⁵. Células Th1, produtoras de grande quantidade de interferon gama (IFN-γ) e linfotoxinas (LT), ativam macrófagos e são consideradas o braço celular do sistema imune para combater patógenos intracelulares. Estão também implicadas na gênese de várias doenças autoimunes e inflamatórias^{20, 21}.

Células Th2, induzidas pela IL-4, produzem IL-4, IL-5 e IL-13 e são particularmente importantes na produção de imunoglobulina E (IgE), indução de eosinofilia e recrutamento de basófilos e mastócitos, sendo capazes de eliminar patógenos extracelulares, incluindo helmintos^{19,26,27}. Podem também

suprimir a imunidade mediada por células Th17, que atuam contra bactérias extracelulares e fungos não adequadamente eliminados pelas respostas Th1 e Th2²⁰.

As ações das vias inflamatórias são contrabalançadas por outro tipo de células TCD4+, chamadas células T regulatórias (Treg), ligadas à supressão de doenças inflamatórias e prevenção de autoimunidade, resultando na inibição das vias Th1, Th2 e Th17.

As células Tregs exercem funções imunossupressoras através de inúmeros mecanismos, alguns deles requerendo contato célula – célula, ou produzindo citocinas como fator transformador de crescimento β (TGF- β), IL-10 e IL-35²⁵. A inibição dessa via está ligada à presença de inflamação e produção de IL-6, a qual combinada com TGF- β , induz à diferenciação do quarto subtipo de células TCD4+, as células Th17.

A recente descoberta desta linhagem de células T CD4+, as células Th17, também chamadas Thi (T helper inflamatório), expandiu o conhecimento sobre a diferenciação celular na cascata imunológica. As células Th17 são originadas sob condição de polarização diferente da das células Th1 ou Th2. A independência da via Th17 (Fig. 1) em relação às vias Th1 e Th2 foi firmemente estabelecida pela identificação da citocina IL-6 e do TGF- β que, combinados aos fatores de transcrição receptor nuclear órfão relacionado ao ácido retinóico (ROR γ t) e STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), são necessários, em camundongos, ao direcionamento para esta nova linhagem²⁰. As células Th17 são altamente pró-inflamatórias e específicas contra antígenos próprios em vários modelos animais de

autoimunidade como: artrite reumatóide, encefalite experimental autoimune, asma e doença de Crohn ^{19,28,29}.

A interleucina 17 (IL-17) humana, principal produto da linhagem Th17, foi originalmente clonada em 1995. Estudos iniciais demonstraram múltiplos efeitos inflamatórios e hematopoiéticos em células epiteliais, endoteliais e fibroblastos. Evidenciaram que a IL-17 atua intensamente em células do estroma, resultando na produção de citocinas inflamatórias e recrutamento, ativação e migração de leucócitos, especialmente neutrófilos, criando uma ligação entre imunidade inata e adaptativa. Embora a via Th17 atue em importante via de defesa, somente recentemente recebeu considerável atenção, despontando como possível mediador de várias desordens autoimunes e inflamatórias. A descoberta das células Th17 trouxe, inclusive, nova perspectiva para a pesquisa e tratamento de inúmeras doenças ³⁰.

4 - Família da Interleucina 17

A IL-17, com gene localizado na região 6p12, foi primeiramente identificada como um transcrito de cDNA de roedores, chamada de CTLA8 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 8*). O produto do gene humano da IL-17A é uma proteína com 150 aminoácidos com peso molecular de 35 kDa ³¹.

IL-17A faz parte da família IL-17, que contém outros 5 membros: IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também chamada de IL-25, associada com a via Th2 e resposta imune contra helmintos) e IL-17F (que apresenta grande homologia com a IL-17A). Tanto a IL-17A como a IL-17F são produzidas por vários tipos

célulares, incluindo subconjuntos de células T CD4+, células T CD8+, células NK e neutrófilos ²⁰.

Os membros da família IL-17 sinalizam através de receptores membros da família IL-17R, composta por IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE ²⁰. O complexo do receptor para IL-17A é multimérico, composto por 2 subunidades de IL-17RA e uma de IL-17RC, e sofre alteração conformacional após a ligação, associando-se ao seu domínio intracelular ³².

O receptor para IL-17A (IL-17RA) é uma proteína transmembrana com aproximadamente 130 kDa. Enquanto a citocina IL-17A é expressa apenas pelas células TCD4+, células TCD8+, células T $\gamma\delta$, neutrófilos, eosinófilos e, em alguns casos, até pelas células T *natural killer* (NKT), o receptor é expresso em todos os tecidos. A ativação do receptor IL-17RA geralmente resulta na indução de outras citocinas pró-inflamatórias através da ativação do Fator Nuclear - $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) ^{19,30}.

O complexo receptor para IL-17A ativado regula também a via MAPkinase, e interage com o adaptador proximal de membrana Act1. Esta sinalização resulta no estímulo da produção de IL-6, IL-1 e NF- $\kappa\beta$ ²⁰.

5 - Diferenciação da via Th17

A diferenciação das células Th17 tem semelhança à das Th1 e Th2, e são facilitadas por uma série de alças de retro-alimentação positivas, principalmente as mediadas por IL-21 e IL-23 (Fig. 2) ³³

Em camundongos, a IL-6 é o fator chave na diferenciação de Th17 a partir de células T CD4+ virgens ¹³. IL-6 e TGF- β têm efeito sinérgico na

indução de ROR γ t, fator de transcrição fundamental na diferenciação de células Th17, tanto em camundongos como em humanos, e a sua expressão resulta na produção de IL-17 ³⁴.

Já os estímulos de IL-21 ou IL-23 juntamente com TGF- β , direcionam as células T virgens para a linhagem Th17 independente de IL-6 ³⁵. A IL-23 promove a proliferação do pool de células produtoras de IL-17, agindo predominantemente em células de memória, desempenhando papel importante na expansão e manutenção das células Th17, mas não na sua diferenciação ^{20,36}.

Por sua vez a IL-21, também um produto das células Th17, parece ser um fator autócrino ³⁰, que amplifica a geração de Th17 e a produção de IL-17. Inibe a produção de IFN- γ ²⁶ e a expressão de Foxp3 ²⁸, e conseqüentemente, as vias Th1 e Treg. Deficiência de IL-21 impede a geração de células Th17 e protege contra algumas doenças autoimunes.

Assim, em camundongos, a IL-21 ou a IL-6, sozinhas, ou em combinação com TGF- β , atuam na expressão do receptor da IL-23 (IL-23R), do ROR γ t e das citocinas Th17 (IL-17A, IL-17F e IL-20) e na inibição da expressão de células Treg e Th1 ²⁸.

Entretanto, demonstrou-se que há diferenças entre o desenvolvimento de células Th17 em camundongos e humanos (Figura. 2).

TGF- β em combinação com IL-1 β , associados à IL-6 ou IL-21, induzem a diferenciação de células Th17, expondo assim a importância da IL-1 β em humanos ^{37, 38, 39}, que apresenta ação efetiva na indução da expressão da proteína IL-17 em células TCD4+, induzida por ROR γ t ³⁹. Desta forma, as

citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-23 e o fator ROR γ t estão implicados na diferenciação e/ou manutenção de células Th17 em humanos.

Figura 2: Diferenciação das células Th17 em camundongos e em humanos: (A) Em camundongos, as células T virgens ativadas em presença de fator transformador de crescimento β (TGF- β) e Interleucina (IL)-6 iniciam a sua diferenciação. A IL-6 aumenta a expressão de IL-21 e do receptor (IL-23R), favorecendo o desenvolvimento das células Th17. Na ausência de IL-6, o TGF- β induz a diferenciação de células T reguladoras. (B) Em humanos a IL-23, ou a IL-1 dirigem a diferenciação das células Th17. O efeito de IL-1 é intensificado pela IL-23 e/ou IL-6. Citocinas das células Th1 inibem o desenvolvimento de células Th17 que expressam IL-23R⁴⁰.

Estudos preliminares mostraram que citocinas como IFN- γ e IL-4, resultantes da diferenciação de células Th1 e Th2, respectivamente, inibiam a diferenciação de células Th17. Esta foi uma das primeiras evidências que a via Th17 representava uma linhagem diferente de células T helper²⁶. A IL-27 também regula negativamente o desenvolvimento de células Th17. É uma citocina heterodimérica, produzida por células dendríticas e macrófagos²⁰ (figura1).

Outra interleucina que tem ação antagônica à das células Th17 é a IL-2, que promove a proliferação de células T tanto quanto produção de citocinas associadas à resposta Th1 e Th2²⁶.

6 - Relação entre células Th17, doenças inflamatórias e autoimunidade

Desde a descoberta da produção de IL-17 por células TCD4+, as células Th17 começaram a ser amplamente estudada em doenças autoimunes e em inflamação de tecidos. Foi observado que células Th17 podem invadir o órgão alvo e promover a inflamação autoimune órgão - específica ²⁰.

Experimentos recentes indicam que as células Th17, produtoras de IL-17, e não as células Th1, produtoras de IFN- γ como postulado anteriormente, podem ser as células efetoras chaves na indução e desenvolvimento de desordens autoimunes e alérgicas. Já está bastante caracterizada a relação da via Th17 com várias patologias em humanos e animais, tais como artrite reumatóide (AR), lúpus eritematoso, psoríase, esclerose múltipla, doenças inflamatórias intestinais e encefalite experimental autoimune (EAE), bem como respostas imunes alérgicas específicas como as doenças respiratórias, tal como asma e inflamações respiratórias.

A IL-17 está diretamente envolvida na destruição da cartilagem e do osso, observadas na artrite reumatóide, tanto em modelo experimental como em humanos⁶². Estudos mostraram que a IL-17 está aumentada no soro e fluidos sinoviais destes pacientes, e que, o aumento da expressão de IL-17 e do RNAm do TNF- α , é preditivo da progressão de graves lesões articulares. Já os níveis elevados de RNAm de IFN- γ (via Th1) sinalizam proteção contra os danos causados pela doença ³⁰.

Camundongos deficientes de IL-17 apresentam redução da artrite induzida por colágeno e o tratamento com antagonista do IL-17RA atenua a sua evolução. Também em animais deficientes de IL-17, a EAE tem início mais tardio e menor gravidade ²⁰.

Recentemente, tem sido aventado um possível papel da via Th17 no diabetes autoimune. Sabe-se que o DM1A tem início quando ocorre um desequilíbrio nos mecanismos de tolerância aos antígenos próprios, resultando na insulite: infiltrado inflamatório composto de linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas.

Tradicionalmente, o DM1A era tido como uma doença mediada por células mononucleares, associada a altos níveis da citocina INF- γ , dependente da via Th1. No entanto, o mais provável é que o DM1A decorra de uma desregulação ampla de extensa rede de células imunes ⁴¹.

A possível relação da via Th17 com o desenvolvimento do diabetes mellitus autoimune foi sugerida em camundongos. A injeção de IL-23 e streptozotocina causa diabetes, associado a apoptose de células β pancreáticas e expressão aumentada de TNF- α , IL-18, IFN- γ e IL-17A, sendo a concentração de IL-17A relacionada com a intensidade das lesões das células β . Injeções apenas de streptozotocina também elevam os níveis circulantes de IL-17A ^{41,42}. Há ainda relatos de aumento de concentração tecidual de IL-17 na progressão do diabetes pós-insulite ⁴³.

Foi evidenciado que o tratamento de camundongos NOD com anticorpo anti-IL17, durante a fase inicial do desenvolvimento do diabetes, pode causar um impacto no seu curso. Principalmente, se o tratamento ocorre antes da manifestação da doença, há diminuição na infiltração linfocitária no pâncreas e nos níveis de autoanticorpos anti-GAD65 ²².

Há uma evidência preliminar que a IL-17A é expressa no pâncreas de camundongos NOD durante a evolução do diabetes e que, a indução de IFN- γ reduz as células Th17 e a produção de IL-17, restabelecendo a

normoglicemia⁴⁵. Em humanos a IL-17 tem efeito deletério em ilhotas pancreáticas in vitro, potencializando respostas inflamatórias e pró-apoptóticas⁴⁶. Imunoterapia com adjuvante de Freund Completo (CFA) reduz a expressão de citocinas relacionadas com a via Th17 e previne diabetes⁴⁷.

Esta forte relação das células Th17 com autoimunidade não descarta a importância da via Th1. Parece que as vias Th1 e Th17 cooperam na indução de desordens autoimunes órgão específicas, estando envolvidas em diferentes estágios do seu desenvolvimento. Korn T et al, em 2007, sugeriu que as células Th17 apresentam maior capacidade de geração de citocinas que as células Th1 durante a inflamação, e que células Th17 direcionam o início da inflamação, enquanto a função das células Th1 seria a de prolongar e perpetuar a inflamação tecidual^{27,19}.

No entanto, outros estudos sugerem efeito protetor das células Th17 em camundongos NOD, principalmente a linhagem de células Th17 diferenciadas a partir de estímulo com TGF- β ⁴⁸. Subtipos de células Th17 TCD4⁺ que produzem IL-10 ou de células T $\gamma\delta$ ⁺ que produzem TGF- β além da IL-17 podem apresentar propriedades regulatórias. Assim, o papel de células T produtoras de IL-17 permanece controverso na patogenia do diabetes, balanço entre as citocinas produzidas pelas células Th17 talvez seja o maior determinante da sua função como patogênica ou tolerogênica⁴⁹.

Justificativa para o estudo da IL-17A

Diabetes mellitus tipo 1A é doença de alta prevalência na infância e adolescência e compromete a qualidade de vida de forma importante. O

conhecimento dos mecanismos que causam a lesão às células β pancreáticas permitirá terapias preventivas futuras.

A IL-17A, citocina altamente inflamatória, está fortemente associada a varias doenças autoimunes no homem e, ao diabetes autoimune em animais. Ainda não há avaliação quanto ao seu papel no diabetes autoimune no homem.

Um trabalho recente do nosso laboratório demonstrou diminuição significativa do receptor da IL-21 em linfocitos T CD3+ e CD4+ em sangue periferico de pacientes com DM1A de inicio recente. A IL-21 é uma das principais ativadoras da via Th17 e a diminuição da expressão do seu receptor poderia comprometer a produção de IL-17A.

No presente projeto pretendemos analisar a importância da IL-17A na patogênese do DM1A através da análise do seu gene, da expressão do seu receptor IL-17RA e da quantificação de seus níveis séricos em pacientes portadores de DM1A em comparação à população controle normal. Também será avaliada sua associação autoanticorpos pancreáticos.

Os objetivos desta pesquisa em pacientes portadores de DM1A e controles normais foi avaliar a importância de IL-17A na patogenia do diabetes tipo 1 autoimune, através da:

- Pesquisa de mutações e/ou polimorfismos no gene da Interleucina-17A;
- Determinação dos níveis séricos de IL-17,
- Avaliação da expressão dos receptores da IL-17 em células periféricas (linfócitos T) num subgrupo de pacientes com DM1A de início recente,
- Associação das variantes polimórficas presentes com os genes do autoanticorpos.

1 - Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes, pais ou tutores antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados (anexo 2). O protocolo de estudo foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) e aprovado - Protocolo de Pesquisa 0221/08 (anexo 1).

2 – Casuística

2.1- Pacientes

A avaliação do gene da IL-17A foi realizada a partir do material genético do Banco de DNA de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1A (Protocolo de Pesquisa 1169105 - CAPPesq) pertencente aos Laboratórios de Investigação Médica – Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio LIM 18 e Laboratório de Genética Molecular LIM 25 da FMUSP. Estes foram recrutados nos ambulatórios de Diabetes do Hospital das Clínicas da FMUSP ou encaminhados por médicos interessados na pesquisa.

As coletas de sangue para avaliação de marcadores imunológicos, genéticos e dosagem de glicemia, peptídeo C e hemoglobina glicada foram feitas após assinatura de termo de consentimento pós-informação.

Foram incluídos 103 pacientes com DM1A, sendo vinte e quatro de início recente (máximo de 6 meses de diagnóstico).

Utilizou-se os seguintes critérios de seleção:

Critérios de Inclusão:

- diagnóstico laboratorial de diabetes: duas glicemias de jejum acima de 126 mg/dl e/ou uma glicemia aleatória acima de 200 mg/dl com sintomas clínicos de diabetes (perda de peso, poliúria)
- evidência laboratorial de diabetes autoimune: presença de um ou mais autoanticorpos pancreáticos positivos e/ou alelos HLA de risco para DM1A
- necessidade precoce e mantida de insulino terapia
- idade de diagnóstico entre 1 e 18 anos

Critérios de exclusão:

- diabetes de causa não autoimune
- presença de doenças cardíacas, hepáticas, renais ou pulmonares crônicas ou agudas
- uso de medicações (exceto insulina)

2.2- Controles

Foram selecionados 102 indivíduos controles saudáveis de faixa etária semelhante à dos pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1A, sem história familiar de Diabetes Mellitus tipo 1A e sem história prévia de qualquer doença autoimune. Vinte e três controles tinham com idade semelhante à

pacientes com DM1A recente, participaram do estudo da expressão do receptor da IL-17A (IL-17RA). Foram excluídos indivíduos que apresentassem autoanticorpos pancreáticos positivos.

3. Avaliação Bioquímica:

3.1. Glicemia

As amostras de sangue foram colhidas com o anticoagulante, ácido etileno diaminotetracético - EDTA. O método utilizado foi o enzimático-colorimétrico, específico para glicose: sistema (glicose oxidase-peroxidase), kit comercial LABTEST GOD-ANA (Brasil). Os valores normais de glicose foram considerados, entre 70 a 99 mg/dL, no plasma em jejum.

3.2. Hemoglobina Glicada

O valor de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) nas amostras sanguíneas, colhidas em tubos contendo EDTA, foi obtido por HPLC (CLAE). Os valores considerados normais foram de 4,1 a 6,0%.

3.3. Auto-anticorpos pancreáticos: Anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e Anti-proteína homóloga à tirosina-fosfatase (anti-IA2)

As dosagens dos anticorpos anti-GAD65 e anti-IA2 foram realizadas por radioimunoensaio (reagentes da RSR, UK), onde o antígeno recombinante (GAD65 ou IA2) marcado com Iodo I^{125} foi incubado, à temperatura ambiente (para anti-GAD) e a 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 conjugada. O imunocomplexo marcado agregado foi separado por centrifugação e a quantificação do 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 variando entre 0,1 UI/mL a 300 U/mL e com anti-IA2 variando entre 0,1 a 50 UI/mL. (Schmidli et al., 1994; Schmidli et al., 1995).

O nível médio de anti-GAD analisado em nosso laboratório em 282 indivíduos controle, foi de $0,12 \pm 0,23$ UI/mL e os coeficientes de variação intra e inter ensaios, de 3 e 5,5%, respectivamente. Foram consideradas negativas as amostras com anti - GAD de 0 a 0,8 UI/mL (média $\pm$ 3DP). Os valores $> 0,8$ UI/mL foram considerados positivos. Em relação ao anti-IA2, os valores médio da população controle foram $0,07 \pm 0,13$ UI/mL e variações intra e inter ensaio foram 4,3% e 3,4%. Foram consideradas negativas as amostras com anti-IA2 variando entre 0 a 0,5 UI/mL (média $\pm$ 3DP). respectivamente. Os valores $> 0,6$ U/mL foram considerados positivos.

4 - Estudo molecular

O DNA genômico foi obtido à partir de 15 mL de sangue periférico, colhidos com 25 mM de EDTA. A técnica utilizada foi a de extração com sal (*salting-out*) (Miller

et al., 1988). O DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro *Ultrospec III* (Amersham Pharmacia Biotech), e as amostras, diluídas na concentração final de 100ng/μL, foram utilizadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

4.1 - Genotipagem do Sistema HLA

4.1.1- 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 Initiators*) 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. Acrescentou-se aos tubos contendo os iniciadores: mistura de oligonucleotídeos, alíquotas de DNA (100 ng/μL) e a enzima Taq-DNA-polimerase 5 U/μL (volume de 2,5 μL para DRB1). A seguir foram submetidos à amplificação com ciclos pré-definidos pelo fabricante em termociclador MJ, com o seguinte programa de ciclagem: 1- 96 °C - 2min e 10 seg., 2 - 61 °C - 1 min, 3 - 96 °C-10seg., 4 – 61 °C -1 min., 5 - repetir as etapas 3 e 4 – 8 vezes., 6 - 96°C -10 seg., 7 - 57 °C - 50 seg., 8 - 72 °C - 30 seg., 9 - repetir etapas 6 a 8 ,19 vezes, finalizando em 15 °C. As amostras de DNA amplificado 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 as fotos, arquivadas em computador e analisadas através de programa específico fornecido pelo fabricante (*One Lambda DNA/LMT versão 3.8*).

4.2 - Amplificação das regiões selecionadas do gene da IL-17A

4.2.1 - Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Para a análise do gene da IL-17A, localizado na região 6p12, composto por região 5' proximal (foram analisados 212 pares de base desta região) e 3 exons (foram utilizados 5 pares de iniciadores descritos na tabela 1. Sequência referência do gene foi usado a partir do banco de dados Ensembl (referência número: ENST00000340057)

Tabela 1 – Pares de iniciadores utilizados na reação em cadeia de polimerase (PCR) e suas respectivas temperaturas de “annealing” dos iniciadores e do tamanho dos fragmentos obtidos após amplificação.

Localização no gene	Iniciadores (“sense” e “antisense”)	T°C	Tamanho esperado do fragmento
Região 5' proximal posição c.-212; e exon 1	5'TGAAAAGAGGACATGGTCTTTAG3' 5'TCTTTCAAACCTGCTGTGTATCAG3'	57°C	481pb
Exon 2	5'TCCAACCTCTCTCTCCTTTCC3' 5'CACAGTGGTCCTTCCAGGTT3'	58°C	366pb
Exon 3	5'TTTTCTGTGGCCTCAGTCT3' 5'TTGAAGGATGAGGGTTCCTG3'	60°C	593pb
	5'CACACTCCCCAAAGCAGTTAG3' 5'AAGGGTTTAATGGAACAGAGAGTT3'	60°C	681pb
	5'CAGCAAGTCTAACTCTCTGTTCCA3' 5'TGCAGAGTGGCCTGAGAATA 3'	60°C	749pb

T°C= temperatura de annealing, pb= pares de base

Para cada reação foi utilizado um volume final de 25µL contendo os reagentes nas seguintes concentrações: 100ng de DNA genômico, 10mM de cada dNTP (*InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA*), 10pmol do iniciador (*InvitrogenTM Life Technologies, Brasil*), 5U/µL da enzima *Taq* DNA polimerase (*InvitrogenTM Life Technologies, Brasil*), tampão de reação 10X e MgCl₂ 50mM, ambos fornecidos pelo fabricante. A amplificação foi realizada no 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 alinhamento (59 – 61°C) de acordo com os iniciadores por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido de um 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 etídio 10mg/mL (*InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) utilizando, como marcador de peso molecular, o *Low DNA Mass Ladder* (*Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, USA*). As amostras foram visualizadas sob transiluminação em luz ultravioleta (Eletronic U.V.Transiluminator – Ultra Lum) e em seguida, fotografadas no fotodocumentador (Vilber Loumart) para posterior análise dos fragmentos amplificados. Na tabela 2 estão detalhados os volumes usados de cada reagente na reação de PCR e figura 3 representação no gel de agarose dos fragmentos amplificados na PCR.

Tabela 2 - Reação de amplificação do DNA (PCR)

Componentes		Solução de uso	Volume para cada reação
Água miilli-Q		-	14µL
Tampão		10x	2,5 µL
dNTP		10mM	1,0 µL
Iniciador	<i>Forward</i>	10pMol	2,5 µL
(<i>sense</i>)			
Iniciador	<i>Reverse</i>	10pMol	2,5 µL
(<i>antisense</i>)			
MgCl ₂		50mM	1,0 µL
<i>Taq</i> DNA Polimerase		5U/µL	0,5 µL
5U/µL			
DNA			1 µL
Total			25 µL

Figura 3: Foto do gel de Agarose a 2%, demonstrando o tamanho dos fragmentos amplificados pela PCR do gene da IL-17A, segundo os pares de oligonucleotídeos selecionados.

4.2.2. Sequenciamento automático:

Para o sequenciamento foram utilizados apenas os produtos amplificados, obedecendo critérios de fragmento de banda única e concentração ≤ 20 ng/ μ L, estimada através da comparação com fragmentos do marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™ Life Technologies, Brasil) em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. Posteriormente, 5 μ L do produto de amplificação foi submetido à purificação enzimática com a adição de 2 μ L da ExoSAP-IT - combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I (*USB Corporation – GE Healthcare*). O volume final de 7 μ L, foi incubado a 37°C por 15 minutos, para degradar o excesso de iniciadores e nucleotídeos, e durante 15 minutos adicionais a 80°C, para inativação da enzima. Decorrida esta etapa, os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento. O protocolo consistiu na adição de: 1,5 μ L de “*Big Dye*” (*ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits - Applied Biosystems-Life Technologies*), 0,5 μ L do iniciador a 10pMol (*Forward* ou *Reverse*) juntamente com 6,0 μ L 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 e finalizado a 15°C, no Veriti® 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems - Life Technologies*). Estes produtos foram submetidos à precipitação com EDTA (125mM)/ Acetato de Na(3M)/ 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) e lidos nos programas *Chromas Lite 2* e *Sequencher 4.8*.

5- Determinação dos níveis séricos de IL-17

Para a determinação dos níveis séricos de IL-17 foi utilizado Kit Quantikine Human IL-17 Immunoassay (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN – USA).

Foram utilizados soros de um subgrupo de 24 pacientes com DM1A, de início recente comparados com 23 controles normais, estocados a – 20 °C.

O procedimento foi realizado de acordo com o manual do kit. Para a preparação dos reagentes foram realizadas diluições seriadas de 1/1000 pg/mL com variações entre 1/500 pg/mL, 1/250 pg/mL, 1/125 pg/mL 1/62,5 pg/mL, 1/31,2 pg/mL até 1/15,6pg/mL

Separados os reagentes e soros, foram utilizadas micro placas de 96 poços (*wells*).

6- Citometria de fluxo

Esta técnica permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão. As células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, que permitem a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e diferentes fluorescências. Após a marcação específica, as células são introduzidas numa câmara de fluxo vibratória. O fluxo de células que atravessa a câmara é envolvido por uma solução tampão, sendo que 500 a 10000 células ou partículas passam em fila simples, por segundo, pelo sensor eletrônico. O fluxo é iluminado por laser de argônio (azul), que tem comprimento de onda de 488 nm. Cada célula é avaliada quanto ao tamanho (dispersor de luz anterior), granulosidade (dispersor de 90°) e intensidade de

fluorescência para detecção de antígenos de superfície diferentes (imunofenotipagem).

A avaliação do tamanho relativo da célula (*“Forward scatter – FSC”*) e da granulosidade ou complexidade interna da célula (*“Side Scatter – SSC”*) permite a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos. A avaliação da intensidade média de fluorescência (MFI) ocorre para detecção de antígenos de superfície diferentes marcados com anticorpos monoclonais específicos para cada célula individualmente. Portanto, a citometria de fluxo pode fornecer dois tipos de informações:

1) avalia dentro da população celular estudada a quantidade total de células que expressam determinada molécula de superfície. Este resultado é dado em porcentagem em relação ao total da população celular estudada.

2) avalia para cada célula a quantidade de moléculas de superfície expressas. Este resultado é a intensidade média de fluorescência (MFI), expresso em logaritmo de base 10.

6.1 - Estudo da expressão do receptor da IL-17A por citometria de fluxo

A avaliação das moléculas de superfície das células sangüíneas foi realizada por citometria de fluxo em sangue total do mesmo subgrupo analisado na IL-17 sérica, coletado em K3EDTA, sendo as amostras processadas imediatamente após a chegada ao laboratório.

Empregou-se os seguintes anticorpos monoclonais conjugados: CD3-FITC, CD4-ECD, CD8-PC5 (Beckman Coulter, Fullerton, CA - USA), associados aos anticorpos anti-receptor IL17R-PE (R&D systems, Minneapolis, MN - USA). Utilizou-se também controles isotípicos IgG1-FITC, IgG1-ECD, IgG1-PE, IgG1-PC5. (Immunotech -

France). Foi feita marcação direta com anticorpos, utilizando-se painéis com quatro marcações.

Para a marcação dos antígenos de superfície celular, 70µl de sangue total foram incubados com doses dos anticorpos monoclonais que variaram de 2 a 5µl durante 20 minutos em ambiente protegido da luz. Ao término da incubação, as hemácias foram lisadas em uma solução de lise IMMUNOPREP (Beckman-Coulter-USA) em um dispositivo automatizado MULTIQ-PREP (Beckman-Coulter-USA).

A seguir, as células foram lavadas duas vezes com 2ml de PBS (pH 7,4) e suplementadas com azida sódica e albumina bovina a 0,02% (PBS-azida), durante 2 minutos a 2000 r.p.m.. O botão celular foi ressuspensão em 400 µl de PBS-paraformaldeído a 4% e submetido à aquisição e análise por citometria de fluxo.

As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo COULTER EPICS-XL MCL (Beckman-Coulter), equipado com laser de argônio, de 488nm, com capacidade para análise de quatro fluorescências diferentes, em programa SYSTEM II. O alinhamento do laser do equipamento foi verificado com a utilização de pérolas de poliestireno, marcadas com quatro fluorocromos diferentes, FLOW-CHECK (Beckman-Coulter), obtendo-se dessa forma valores percentuais das subpopulações de linfócitos.

Foram adquiridas 10.000 células dentro do *gate* de linfócitos, no gráfico de FS x SS. As fluorescências foram analisadas em gráficos de quadrante (ou dot plot): FL4 X FL2; FL4 X FL3; FL1 X FL2; FL1 X FL3, FL1xFL4 Posteriormente, os resultados foram salvos em modo *listmode* do programa Summit v 4.0, e as amostras reanalisadas utilizando *gate* em células CD3+. Os valores em percentual obtidos no citômetro foram transformados em valores absolutos com base no número total de linfócitos obtidos em contador hematológico CELL-DYN 1400 (Abbott).

7 - Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelos programas GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad software, LaJolla, CA – USA) e SPSS 16.0 *for Windows* (SPSS Inc., Chicaco, IL- USA). Foi considerada significância estatística quando $p \leq 0,05$. As variáveis categóricas foram apresentadas por valores absolutos e relativos (frequências). Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão (DP) ou como mediana e percentis 5 e 95, para população com distribuição normal ou não, respectivamente, segundo o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. A diferença entre os grupos para variáveis numéricas com distribuição normal foi analisada pelo Teste t de Student, enquanto variáveis com distribuição não paramétrica foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste Qui-quadrado de Pearson para grandes amostras ou Fisher para pequenas amostras. No estudo genético, o valor de p foi multiplicado pelo número de comparações ou alelos testados (método de Bonferroni - p_c) sendo significativo quando $p_c \leq 0,05$. O risco relativo (RR) foi calculado por correção de Woolf. A análise de correlação entre amostras foi realizada através do teste de correlação de Spearman (r).

8- Estratégia do estudo

Cento e três pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1A foram selecionados. DNA genômico utilizado no estudo dos alelos HLA –DR e do gene da IL-17A. Também foram dosados os autoanticorpos pancreáticos (AC anti-GAD65 e AC anti-IA2), glicemia e HbA1c de todos os pacientes. Um subgrupo de 24 pacientes com diagnóstico recente (intervalo de tempo menor de 6 meses). Foi submetido o estudo

de citometria de fluxo para quantificação do receptor de superfície: IL-17RA, bem como dosagem de IL-17 sérica por ELISA. Os 102 pacientes do grupo controle realizaram os mesmos procedimentos de dosagens bioquímicas e análise genética e em 23 deles também o estudo para quantificação dos receptores de IL-17A e IL-17 sérica. Na figura 4 temos o fluxograma descritivo da estratégia do estudo.

Figura 4: Fluxograma esquemático da estratégia do estudo.

1 - Achados Clínicos

Neste estudo analisamos 205 indivíduos, sendo 103 pacientes com DM1A e 102 controles normais. As características destes dois grupos encontram-se na tabela 3. Parâmetros clínicos, marcadores genéticos dos participantes do projeto bem como as freqüências dos autoanticorpos estão no anexo 3 e 4.

Tabela 3: Características dos pacientes com diabetes mellitus tipo 1A (DM1A) e controles normais.

	N	Idade (anos)	p*	Sexo		p*	Etnia		p*
				F n(%)	M n(%)		C n(%)	NC n(%)	
DM1A	103	17,16 ± 11,02	<0,0001 ^a	53 (51)	50 (49)	0,161 ^b	75 (73)	28 (27)	0,061 ^b
Controles	102	25 ± 13,8		63 (62)	39 (38)		85 (85,2)	17 (16,8)	

a=Teste t Student; b= Test Qui-quadrado de Pearson; F=feminino e M=masculino; C= caucásios e NC=não caucásios

A idade de diagnóstico dos pacientes portadores de DM1A foi 10,1±8,5 anos e, por ocasião da avaliação, a duração da doença, de 7,9±8,8 anos.

Os autoanticorpos auto-GAD65 e anti-IA2 foram observados em 56% e 45% dos pacientes com DM1A e em 0% e 0% dos indivíduos controles, respectivamente. Dados referentes aos parâmetros laboratoriais estão na tabela 4.

Tabela 4: Valores laboratoriais de pacientes com DM1A e indivíduos controles.

	DM1A	Controles	P
Glicemia (mg/dL) (média $\pm$ DP)	173,20 $\pm$ 95,35	79,99 $\pm$ 8,85	< 0,0001 ^a
HbA1C (%) (média $\pm$ DP)	8,474 $\pm$ 2,19	5,41 $\pm$ 0,58	< 0,0001 ^a
Anti-GAD positivos n(%) /determinação	54 (99 dosados)	1(98 dosados)	< 0,0001 ^b
Anti-IA2 positivos n(%) /determinação	51 (98 dosados)	0 (91 dosados)	< 0,0001 ^b

a=Teste t student; b=Teste exato de fisher

2. Achados Moleculares

2.1. Gene da IL-17A

Foram observadas em nossa população 14 variantes alélicas já descritas (Banco de dados *Ensembl Genome*): três polimorfismos na região promotora [rs2275913 (G/A), rs8193037 (G/A), rs17879568 (G/A)], duas no intron 1 [rs3819025 (G/A), rs8193038 (A/G)], uma no intron 2 [rs17881747 (C/T)] e oito no exon 3 rs17880588 [(G/A), rs17878530 (C/T), rs7747909 (G/A), rs17886754 (C/T), rs11351315 (T/- deleção), rs17883570 (T/G), rs1974226 (C/T), rs3748067 (C/T)].

Descrevemos três novas variantes alélicas em heterozigose na região não codificadora do exon 3 (3'UTR). A primeira variante com troca de timina por citosina c.*911T>C (figuras 5 e 6) foi encontrada em 2 pacientes com DM1A e 1 controle normal, a segunda com troca de citosina por timina c.*1116C>T (figuras 7 e 8) em apenas 1 controle normal, e a terceira com

troca guanina por citosina c.*1184G>C (figuras 9 e 10) em 2 pacientes com DM1A, 1 controle normal e 1 controle com anti-GAD positivo, mas sem manifestação clínica de DM1A (que foi excluído da casuística de controles).

Todas as variantes alélicas novas estão especificadas a seguir:

```

TAAATGTATTTTAGCAAACCTCAGCTCTTCCCTATTGGGAAGAGTTATGCAAATTCTCCTA
TAAGCAAAACAAAGCATGTCTTTGAGTAACAATGACCTGGAAATACCCAAAATTCCAAGT
TCTCGATTTTACATGCCTTCAAGACTGAACACCGAATAAGGTTTTCATACTATTAGCCAA
TGCTGTAGACAGAAGCATTGATAGGAATAGAGCAAATAAGATAATGGCCCTGAGGAAT
GGCATGTCATTATTAAAGATCATATGGGGAAAATGAAACCCTCCYCAAAATACAAGAAGT
TCTGGGAGGAGACATTGTCTTCAGACTACAATGTCCAGTTTCTCCCTAGACTCAGGCTT

```

Figura 5: Localização da variante alélica não descrita no gene da IL-17A no exon 3 na posição: c.*911T>C

Figura 6: Eletroesferograma parcial do gene da IL-17A. Paine A: um paciente com DM1A sem a variante. Paine B: um paciente com DM1A com a nova variante alélica. As setas indicam a localização da variante.

```

GGCATGTCATTATTAAAGATCATATGGGGAAAATGAAACCCTCCYCAAAATACAAGAAGT
TCTGGGAGGAGACATTGTCTTCAGACTACAATGTCCAGTTTCTCCCTAGACTCAGGCTT
TTTTGGAGATTAAAGGCCCCCTCAGAGATCAACAGAACCAACATTTTCTCTTCTCAAGCA
ACACTGCTAGGGCCCTGGCTTCTGTCTGATCAAGGCACCCACACAACCCAGAAAGGAGCTGA

```

Figura 7: Localização da variante alélica não descrita no gene da IL-17A no exon3 na posição: c.*1116C>T

Figura 8: Eletroesferograma parcial do gene da IL-17A. Painei A: um paciente com DM1A sem a variante. Painei B: um controle com a nova variante alélica. As setas indicam a localização da variante.

Figura 9: Localização da variante alélica não descrita no gene da IL-17A no exon 3 na posição: c.*1184G>C

Figura 10: Eletroesferograma parcial do gene da IL-17A. Painei A: um paciente com DM1A sem a variante. Painei B: um controle normal com a nova variante alélica. As setas indicam a localização da variante.

Foi realizada uma análise de predição da estabilidade da proteína devido a possíveis alterações no sinal da cauda poliadenilação – Poly(A) do RNAm, através do programa POLYA SCAN (www.gene-regulation.com). Não se identificou diferença no sinal com as novas variantes alélicas não descritas

localizadas na região não codificadora do exon 3 (3'UTR) tanto em pacientes DM1A como em controles normais.

As freqüências genótípicas das 17 variantes analisadas no gene da IL-17 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto a do polimorfismo rs1974226 C/T no exon 3 ($p=0,003$) em controles normais.

Não houve diferença na freqüência dos polimorfismos entre diabéticos e controles normais (tabela 5) (anexo 5).

Tabela 5: Frequência genotípica dos polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais.

Polimorfismo	Genótipo	DM1A n(%)	Controle n(%)	p*
rs2275913	GG	56(54,3)	64(63,3)	0,192
	GA/AA	47(45,7)	37(37,7)	
rs8193037	GG	100(97)	95(92,2)	0,189
	GA	3(3)	7(7,8)	
rs17879568	GG	103(100)	99(97)	0,080
	GA		3(3)	
rs3819025	GG	76(73,7)	69(67,6)	0,334
	GA/AA	27(26,3)	33(32,4)	
rs8193038	AA	98(95,1)	94(92,1)	0,125
	GA	3(4,9)	8(7,9)	
rs17881747	CC	94(91,2)	91(89,2)	0,621
	CT	9(8,8)	11(10,8)	
rs17880588	GG	101(98)	101(99)	0,567
	GA	2(2)	1(1)	
rs17878530	CC	103(100)	102(100)	-
rs7747909	GG	64(62,1)	67(65,6)	0,597
	GA /AA	39(37,9)	35(34,4)	
c.*911T>C	TT	101(98)	100(99)	0,567
	CT	2(2)	1(1)	
rs17886754	CC	103(100)	102(99)	0,316
	CT		1(1)	
c.*1116C>T	CC	103(100)	100(99)	0,311
	CT		1(1)	
rs11351315	TT	103(100)	102(100)	-
c.*1184G>C	GG	101(98)	99(97)	0,984
	GC	2(2)	2(3)	
rs17883570	TT	103(100)	102(99)	0,316
			1(1)	
rs1974226	CC	75(72,8)	73(71,5)	0,842
	CT /TT	28(27,2)	29(28,5)	
rs3748067	CC	94(91,2)	90(88,2)	0,475
	CT	9(8,8)	12(11,8)	

*Teste do Qui-quadrado de Pearson

Nos pacientes com DM1A, a frequência do autoanticorpo anti-GAD65 foi maior em não portadores do polimorfismo rs17881747 C/T ($p=0,041$) (tabela 6). A frequência do autoanticorpo anti-IA2 foi maior nos portadores do polimorfismo rs3819025 G/A ($p=0,041$) e das variantes alélicas não descritas nas posições c.*911T>C e c.*1184G>C ($p=0,003$ para ambas) (tabela 7).

Tabela 6: Frequência genotípica das variantes alélicas gene da IL-17A, segundo presença de anticorpo anti-GAD65 em pacientes com DM1A.

Polimorfismo	Genótipo	Anti-GAD Positivo n(%)	Anti-GAD Negativo n(%)	p*
rs2275913	GG	28(52)	24(53)	0,883
	GA/AA	26(48)	21(47)	
rs8193037	GG	53(99)	43(95)	0,454
	GA	1(1)	2(5)	
rs17879568	GG	54(100)	45(100)	-
rs3819025	GG	36(66)	37(82)	0,080
	GA/AA	18(44)	8(18)	
rs8193038	AA	53(99)	43(95)	0,474
	GA	1(1)	2(5)	
rs17881747	CC	52(96)	38(84)	0,041
	CT	2(4)	7(16)	
rs17880588	GG	53(99)	44(99)	0,896
	GA	1(1)	1(1)	
rs17878530	CC	54(100)	45(100)	-
rs7747909	GG	35(65)	25(55)	0,348
	GA /AA	19(25)	20(45)	
c.*911T>C	TT	52(96)	45(100)	0,344
	CT	2(4)		
rs17886754	CC	54(100)	45(100)	-
c.*1116C>T	CC	54(100)	45(100)	-
	TT			
rs11351315	TT	54(100)	45(100)	-
c.*1184G>C	GG	52(96)	45(100)	0,344
	GC	2(4)		
rs17883570	TT	54(54,5)	45(45,5)	-
rs1974226	CC	40(40,4)	33(33,3)	0,934
	CT /TT	14(14,1)	12(12,1)	
rs3748067	CC	48(48,5)	42(42,4)	0,444
	CT	6(6,1)	3(3)	

*Teste do Qui-quadrado de Pearson

Tabela 7: Frequência genotípica dos polimorfismos no gene da IL-17A, segundo presença de anticorpo anti-IA2 em pacientes com DM1A.

Polimorfismo	Genótipo	Anti-IA2 Positivo - n(%)	Anti-IA2 Negativo n(%)	p*
rs2275913	GG	26(51)	26(55)	0,667
	GA/AA	25(49)	21(45)	
rs8193037	GG	51(100)	44(93)	0,067
	GA		3(7)	
rs17879568	GG	51(100)	47(100)	-
rs3819025	GG	33(64)	39(82)	0,041
	GA/AA	18(36)	8(18)	
rs8193038	AA	51(100)	44(93)	0,067
	GA		3(7)	
rs17881747	CC	45(88)	44(93)	0,375
	CT	6(12)	3(7)	
rs17880588	GG	51(100)	45(95)	0,137
	GA		2(5)	
rs17878530	CC	51(100)	47(100)	-
rs7747909	GG	30(59)	30(63)	0,611
	GA /AA	21(41)	17(37)	
c.*911T>C	TT	50(98)	46(98)	0,003
	CT	1(2)	1(2)	
rs17886754	CC	51(100)	47(100)	-
c.*1116C>T	CC	51(100)	47(100)	-
	TT			
rs11351315	TT	51(52)	47(48)	-
c.*1184G>C	GG	50(98)	46(98)	0,003
	GC	1(2)	1(2)	
rs17883570	TT	51(52)	47(48)	-
rs1974226	CC	37(37,8)	36(36,2)	0,646
	CT /TT	14(14,3)	11(11,2)	
rs3748067	CC	47(48)	42(42,9)	0,632
	CT	4(4,1)	5(5,1)	

*Teste do Qui-quadrado de Pearson

Quanto à etnia (tabela 8) os polimorfismos rs17881747 e o rs7747909 prevaleceram em pacientes com DM1A caucasóides ($p=0,045$ e $p=0,036$, respectivamente) em relação aos não caucasóides. E nos controles, a variante alélica não descrita c.*911T>C foi mais frequente nos não caucasóides

($p=0,021$). A frequência dos polimorfismos não diferiu quanto ao sexo (tabela 9).

Tabela 8: Frequência genotípica das variantes alélicas no gene da IL-17A em pacientes com DM1A segundo etnia.

Polimorfismo	Genótipo	DM1A			Controles		
		C n(%)	NC n(%)	p*	C n(%)	NC n(%)	p*
rs2275913	GG	37(49,3)	19(67,8)	0,93	53(63,8)	11(73,4)	0,414
	GA/AA	38(50,7)	9(32,2)		32(36,2)	4(26,4)	
rs8193037	GG	73(97,3)	27(96,4)	0,808	79(93)	15(93,7)	0,907
	GA	2(2,3)	1(3,6)		6(7)	1(6,3)	
rs17879568	GG	75(100)	28(100)	-	82(96,4)	16(100)	0,446
	GA				3(3,6)		
rs3819025	GG	55(73,3)	21(75)	0,864	58(68,2)	10(62,5)	0,654
	GA/AA	20(26,7)	7(25)		27(31,8)	6(37,5)	
rs8193038	AA	71(94,6)	27(96,4)	0,826	78(91,7)	15(93,7)	0,787
	GA	2(5,4)	1(3,6)		7(8,3)	1(6,3)	
rs17881747	CC	71(94,6)	23(82,1)	0,045	77(90,5)	13(81,2)	0,271
	CT	45,4)	5(17,8)		8(9,5)	3(18,8)	
rs17880588	GG	74(98,6)	27(94,6)	0,464	84(99)	16(100)	0,663
	GA	1(1,4)	1(3,4)		1(1)		
rs17878530	CC	75(100)	28(100)	-	85(100)	16(100)	-
rs7747909	GG	42(56)	22(78,5)	0,036	54(63,5)	12(75)	0,376
	GA /AA	33(44)	6(21,5)		31(36,5)	4(25)	
c.*911T>C	TT	74(98,6)	27(94,6)	0,464	85(100)	15(93,7)	0,021
	CT	1(1,4)	1(3,4)			1(6,3)	
rs17886754	CC	75(100)	28(100)	-	85(100)	16(100)	-
c.*1116C>T	CC	75(100)	28(100)	-	84(99)	16(100)	0,663
	CT				1(1)		
rs11351315	TT	75(100)	28(100)	-	85(100)	16(100)	-
c.*1184G>C	GG	73(97,3)	28(100)	0,383	84 (99)	15(99)	0,181
	GC	2(2,7)			1(1)	1(1)	
rs17883570	TT	75(100)	28(100)	-	85(100)	16(100)	-
rs1974226	CC	56(74,6)	19(67,8)	0,490	58(68,2)	14(87,5)	0,118
	CT /TT	19(25,4)	9(32,2)		27(31,8)	2(12,5)	
rs3748067	CC	68(90,6)	26(92,9)	0,726	76(89,4)	13(81,2)	0,355
	CT	7(9,4)	2(7,1)		9(10,6)	3(18,8)	

*Teste Qui-quadrado de Pearson; C=caucasóide e NC=não caucasóide.

Tabela 9: Frequência genotípica das variantes alélicas no gene da IL-17A em pacientes com DM1A segundo sexo.

Polimorfismo	Genótipo	F n(%)	M n(%)	p*	F	M	p*
rs2275913	GG	27(50,9)	29(58)	0,472	40(65,5)	24(61,5)	0,682
	GA/AA	26(49,1)	21(42)		21(34,5)	15(38,5)	
rs8193037	GG	52(98,1)	48(96)	0,524	57(91,9)	37(94,8)	0,572
	GA	1(1,9)	2(4)		5(7,1)	2(5,2)	
rs17879568	GG	53(100)	50(100)	-	61(98,3)	37(94,8)	0,311
	GA				1(1,7)	2(5,2)	
rs3819025	GG	41(77,5)	35(70)	0,396	42(67,7)	26(66,7)	0,911
	GA/AA	12(22,5)	15(30)		20(32,3)	13(33,3)	
rs8193038	AA	53(100)	46(92)	0,70	57(92)	36(92,3)	0,946
	GA		3(8)		5(8)	3(7,7)	
rs17881747	CC	50(94,4)	44(88)	0,255	56(90,3)	34(87,1)	0,622
	CT	3(6)	6(12)		6(9,7)	5(2,9)	
rs17880588	GG	52(98,1)	49(98)	0,967	62(100)	38(97)	0,205
	GA	1(1,9)	1(2)			1(3)	
rs17878530	CC	53(100)	50(100)	-	62(100)	39(100)	-
rs7747909	GG	31(58,4)	33(66)	0,432	40(64)	26(66)	0,825
	GA /AA	22(41,6)	17(44)		22(36)	13(34)	
c.*911T>C	TT	52(98,1)	49(98)	0,967	61(98)	39(100)	0,425
	CT	1(1,9)	1(2)		1(2)		
rs17886754	CC	53(100)	50(100)	-	62(100)	39(100)	-
c.*1116C>T	CC	53(100)	50(100)	-	61(98)	39(100)	0,425
	CT				1(2)		
rs11351315	TT	53(100)	50(100)	-	62(100)	39(100)	-
c.*1184G>C	GG	52(98,1)	49(98)	0,967	60(96)	39(100)	0,257
	GC	1(1,9)	1(2)		2(4)		
rs17883570	TT	53(100)	50(100)	-	62(100)	39(100)	-
rs1974226	CC	36(68)	39(97,5)	0,251	41(66)	31(79)	0,149
	CT /TT	17(32)	11(2,5)		21(34)	8(21)	
rs3748067	CC	49(92,4)	45(90)	0,660	54(87)	35(90)	0,689
	CT	4(7,6)	5(10)		8(13)	4(10)	

*Teste qui-quadrado de Pearson; F=feminino e M= masculino

2.2 Sistema HLA

Dezoito indivíduos controles não foram genotipados quanto ao HLA.

Oitenta e um (78,7%) pacientes e 36 (42,9%) controles normais apresentaram

pelo menos um alelo HLA de risco para DM1A (-DR3 e/ou -DR4). A frequência dos genótipos HLA DR3/DR4 foi maior nos pacientes e do genótipo HLA não DR3/não DR4 nos controles. (tabela 10).

Dados dos marcadores genéticos do Sistema HLA (alelo específicos), referente aos pacientes DM1A e controles normais, encontram-se nos anexos 3 e 4.

Tabela 10: Frequência dos genótipos HLA-DRB1 em pacientes com DM1A e controles normais.

HLA - DRB1	DM1A n(%)	Controles n (%)	p	p _c	RR	IC
DR3/DR3	11 (10%) (N=103)	1(1%) (N=84)	0,0131	0,039	9,924	1,253 a 78,568
DR4/DR4	3 (3%)	0	0,2538			
DR3/DR4	29 (28%)	2 (2%)	< 0,0001	0,0003	16,068	3,704 a 69,694
X/ Y	22 (21%)	48 (58%)	< 0,0001	0,0003	0,2037	0,1075 a 0,3861
DR3/X	16 (15%)	16 (19%)	0,7816			
DR4/Y	22 (23%)	17 (20%)	1			

p= Teste t student; p_c = p corrigido (Bonferroni); RR = risco relativo. IC = intervalo de confiança

3. Análise da IL-17 sérica e expressão do receptor da IL-17A

A dosagem de IL-17 sérica, bem como a expressão do receptor da IL-17A foram realizadas em 24 pacientes com diagnóstico recente de diabetes (menor que 6 meses) e idade $10 \pm 4,6$ anos.

Foram comparados com 23 controles normais saudáveis, sem histórico familiar de diabetes tipo 1 ou 2, e idade de $8,5 \pm 4,3$ anos. As características clínicas desses pacientes diabéticos de diagnóstico recente e dos controles normais e as frequências dos autoanticorpos estão na tabela 11.

Tabela 11: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com DM1A recente e controles normais.

	DM1A	Controles	p*
Número de indivíduos	24	23	
Idade atual (anos)	10 ± 4,6	8,5 ± 4,3	0,405 ^a
Idade diagnóstico (anos)	9,1 ± 5,1	-	
Duração do diabetes (meses)	3 meses	-	
Glicemia (mg/dL)	143,5 ± 100,7	80,8 ± 7,95	0,006 ^a
HbA1C (%)	9,7 ± 2,2	5,5 ± 0,4	0,007 ^a
Masculino\ Feminino	15 (63%) \ 9 (37%)	12 (53%) \ 11 (43%)	
Caucasóides	15 (62,5%)	22 (95,6%)	0,561 ^b
Não caucasóides	9 (37,5%)	1 (4,4%)	0,512 ^b
Anti-GAD positivo	13/24 (54%)	0/23 (0%)	<0,0001 ^b
Anti-IA2 positivo	17/24 (70%)	0/23 (0%)	<0,0001 ^b

*a= Teste t student; b=Teste exato de Fisher

3 1. Resultados dosagem de IL-17A sérica.

O valores de IL-17A foram baixos e grande parte deles (anexo 6), inferiores ao limite de detecção do método (15pg/mL) nos dois grupos. A IL-17 A foi detectada em apenas 1 de 24 pacientes DM1A (4,2%) e em 6 de 23 (26,1%) controles normais – p= 0,0479

3.2. Expressão do receptor da IL-17RA

3.2.2. Resultados da Citometria de Fluxo

Na citometria de fluxo foram identificados os linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ (tabela 12) e determinada a expressão do receptor de IL-17A (IL-17RA) em cada tipo de célula (tabela 13). Não houve diferença estatística no número de linfócitos totais ou no percentual de linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ entre o grupo dos pacientes diabéticos e o grupo controle (anexo 7).

Verificamos, pela primeira vez, em pacientes portadores de DM1A, a diminuição estatisticamente significativa da expressão de IL-17RA tanto em linfócitos T CD3+ (figura 11) quanto em linfócitos T CD4+ (figura 12).

Tabela 12: Identificação dos linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+.

DM1A	linfócitos	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)
Mediana	2600	0,731	0,406	0,2585
Percentil 5	1830	0,537	0,299	0,1908
Percentil 95	5095	0,786	0,496	0,3795
Controles				
Mediana	2400	0,67	0,377	0,235
Percentil 5	1610	0,526	0,284	0,1793
Percentil 95	4360	0,766	0,484	0,3007
p*	0,6017	0,120	0,400	0,2921

*Teste de Mann Whitney

Tabela 13: Expressão do IL-17RA em linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+.

DM1A	Expressão de IL-17A em linfócitos TCD3+ (%)	Expressão de IL-17A em linfócitos TCD4+ (%)	Expressão de IL-17A em linfócitos TCD8+ (%)
Mediana	0,313	0,111	0,1785
Percentil 5	0,1753	0,0547	0,0607
Percentil 95	0,5909	0,3527	0,3311
Controles			
Mediana	0,436	0,252	0,176
Percentil 5	0,2752	0,1092	0,0879
Percentil 95	0,6455	0,3737	0,2503
p*	0,041	0,0019	0,6473

*Teste de Mann Whitney

Figura 11: Expressão do receptor da interleucina 17A(IL-17RA) em linfócitos T CD3⁺ periféricos em pacientes DM1A e controles

Figura 12: Expressão do receptor da Interleucina-17 em linfócitos T CD4⁺ periféricos em pacientes DM1A e controles

Avaliamos também a intensidade média de fluorescência do receptor da interleucina 17. Não verificamos diferença estatisticamente significativa na MFI do IL-17RA em pacientes portadores de DM1A quando comparados a controles sadios (tabela 14). No anexo 8, temos os dados completos da Intensidade Média de Fluorescência do receptor da IL-17RA em pacientes e controles.

Tabela 14: Intensidade média de Fluorescência (MFI) para o receptor da IL-17A em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles.

	DM1A	Controles
Mediana	10,34	18,68
Percentil 5	3,45	6,27
Percentil 95	57,05	40,12
p*		0,0865

*Teste de Mann Whitney

4. Correlação entre os valores de expressão de IL-17RA e valores metabólicos

Correlacionamos a expressão do IL-17RA em linfócitos TCD3+ e TCD4+ com os valores de glicemia, hemoglobina glicada, autoanticorpos anti-GAD e anti-IA2. Observamos que não houve correlação entre estes parâmetros e a expressão de IL-17RA em linfócitos T CD3+ e TCD4+ (anexo 9).

O diabetes mellitus tipo 1A é uma doença autoimune mediada pela infiltração das ilhotas pancreáticas por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ autoreativos, linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. A destruição das células β advém do intenso processo inflamatório local e produção de várias citocinas, cujos mecanismos de ativação não estão totalmente esclarecidos, sendo coordenados por fatores genéticos e ambientais. A interleucina 17A é uma citocina pró-inflamatória implicada, juntamente com seu receptor²⁰, em diversas doenças autoimunes, tais como artrite reumatóide, psoríase e lupus eritematoso. Em camundongos NOD, a IL-17A é fortemente associada ao diabetes autoimune, mas, em humanos, no entanto, ainda não há evidências que claramente relacionem a via Th17 com o DM1A. Neste estudo, buscamos determinar o seu papel na gênese e nas manifestações clínicas do diabetes autoimune no homem.

Nós observamos, em 103 pacientes com DM1A, 17 variantes alélicas no gene da IL-17A e região 5'proximal c.-212, sendo 14 variantes já descritas e 3 novas. E comparamos os resultados com 102 controles normais.

Avaliamos qual a contribuição destas variantes alélicas na predisposição ao diabetes e nas manifestações autoimunes - títulos de autoanticorpos relacionados à doença (anti-GAD65 e anti-IA2).

Não observamos diferença na frequência das 17 variantes alélicas entre pacientes com DM1A e controles, sugerindo que mutações ou polimorfismos no gene da IL-17 não estão implicados na predisposição ao DM1A em humanos. Este dado é inédito na literatura.

Eventual efeito dos polimorfismos na estabilidade da proteína IL-17 A também não foi confirmado. Identificamos 3 variantes alélicas na região não codificadora no exon 3 (3'UTR), mas que não implicaram em mudança no sinal da cauda PolyA, tanto nos pacientes DM1A como nos controles.

Quanto à influência deste gene na gênese de outras doenças autoimunes, os dados de literatura são escassos. Foram analisados alguns polimorfismos. Entre eles, o rs2275913, localizado na região promotora, que apresentou associação com retocolite ulcerativa e artrite reumatóide em população caucasiana⁵⁰. Esta variante foi incluída em nosso estudo, porém não observamos associação com o DM1A.

Outro estudo mostrou fraca evidência de associação do polimorfismo intrônico rs3804513 com destruição articular na artrite reumatóide precoce, mas não com o risco de desenvolvimento da doença em japoneses⁵¹, sugerindo também pouca influência deste gene na predisposição a doenças autoimunes. O polimorfismo rs3804513 é monomórfico não ocorre em populações caucasianas (HapMap, 2007) e não foi incluído em nosso estudo.

Quanto à influência das variantes alélicas na intensidade da resposta imune, observamos maior frequência do autoanticorpo anti-GAD65 nos pacientes com DM1A portadores do polimorfismo rs17881747 C/T ($p=0,041$) e do anti-IA2, para o polimorfismo rs3819025 G/A ($p=0,041$) e variantes alélicas não descritas c.*911T>C e c.*1184G>C ($p=0,003$). Considerando que os autoanticorpos podem desaparecer com o passar do tempo, e vários pacientes apresentavam diabetes há mais de 15-20 anos, avaliamos apenas aqueles com duração do diabetes até 2 anos ($n=46$), período com títulos e frequência elevados dos autoanticorpos. Neste subgrupo, não observamos efeito destes polimorfismos na frequência dos autoanticorpos. Embora não tenhamos confirmado os resultados anteriores (talvez pela pequena casuística - $n=46$), não podemos afastar a possibilidade destas 3 variantes estarem associadas à maior permanência dos autoanticorpos.

Ainda neste subgrupo de pacientes, com duração do diabetes inferior a 2 anos ($n=46$), os títulos de anti-GAD65 foram menores nos pacientes portadores do

polimorfismo rs3748067 ($5,0 \pm 5,5$ U/mL) em relação aos portadores do alelo selvagem ($13,9 \pm 24$ U/mL) ($p = 0,03$).

A influência destes polimorfismos na intensidade da resposta imune requer confirmação em maior número de pacientes.

Considerando que o DM1A prevalece nas populações da raça branca, e nossa população é representada por mistura de brancos, negros e índios, buscamos averiguar a frequência destes polimorfismos em caucasóides e não caucasóides. Embora os grupos DM1A e controles não diferissem quanto à etnia, analisamos os grupos separadamente. Os polimorfismos rs17881747 e o rs7747909 prevaleceram em pacientes DM1A caucasóides ($p = 0,045$ e $p = 0,036$, respectivamente) e a variante alélica não descrita c.*911T>C ($p = 0,021$), nos controles não caucasóides. A análise destes polimorfismos em subgrupos de caucasóides (diabéticos e controles), contemplando maior casuística, poderá esclarecer estes resultados.

Não houve diferença na frequência genotípica dos 17 polimorfismos da IL-17A segundo o sexo nos dois grupos quando avaliados separadamente, ou em conjunto, independentemente da presença da doença.

A IL-17A tem ação pró-inflamatória. Em modelos animais, sua expressão está aumentada na insulite⁴³ e, procedimentos que bloqueiam a ação da IL-17A, reduzem a progressão da doença⁵².

Pacientes com DM1A de início recente tem elevada frequência de monócitos que induzem a via Th17⁵³ e alta proporção de linfócitos T CD4+ e CD8+ que secretam IL-17⁵⁴. Esta citocina está também está fortemente associada a outras doenças autoimunes, sendo considerada de extrema importância na artrite reumatóide, onde cursa com concentrações elevadas na sinovia dos pacientes no estágio inicial da doença⁵⁵ e no lúpus, onde se correlaciona com a atividade da doença⁵⁶.

Frente a estes dados, julgamos importante verificar a sua expressão no DM1A. Determinamos as concentrações séricas de IL-17A em 24 pacientes portadores de DM1A de início recente (máximo de seis meses de diagnóstico), por ser este o grupo com maior frequência de autoanticorpos e, provavelmente, maior intensidade do processo autoimune em andamento.

Verificamos, pela primeira vez, que a concentração sérica de IL-17A não está aumentada no sangue circulante em pacientes com DM1A de início recente. As concentrações de IL-17A foram indetectáveis (inferiores ao limite inferior de detecção do ensaio) em parte considerável de nossa casuística, mas a frequência de pacientes DM1A com IL-17A mensurável foi menor que a do grupo controle ($p=0,0479$). Este dado é inédito na literatura.

Hiperglicemia ou fatores relacionados com o descontrole metabólico poderiam ter interferido na produção de IL-17A. Considerando que pacientes DM1A de início recente têm secreção espontânea aumentada das citocinas IL-1 β e IL-6, que ativam a via Th17⁵³, mas não os portadores de diabetes tipo 2, este dado sugere que a hiperglicemia não é o fator causal desta alteração. Entretanto, pacientes com síndrome metabólica e pacientes com diabetes tipo 2 e nefropatia também têm níveis de IL-17A diminuídos o que não nos permite afastar o eventual impacto de alterações metabólicas nos nossos resultados^{57,58}.

Por outro lado, diferentemente do observado na artrite reumatóide e no lúpus, onde as concentrações de IL-17 estão elevadas, os estudos em animais e humanos têm evidenciado aumento da produção de IL-17 no sítio da lesão ou após estimulação de linfócitos ou monócitos *in vitro*^{46,49}. Assim, a análise do sangue periférico pode não ter espelhado adequadamente o processo inflamatório na ilhota, mas não explica as reduzidas concentrações de IL-17A observadas na nossa população.

Finalmente, analisamos a expressão dos receptores de IL-17 nos mesmos 24 pacientes portadores de DM1A de início recente (máximo de seis meses de diagnóstico), considerando que, nesta fase, o processo autoimune ainda é ativo e intenso. Este grupo de pacientes foi comparado a um grupo controle, sem antecedentes de autoimunidade familiar e pareado para idade e sexo, considerando que a distribuição dos linfócitos varia com as diferentes faixas etárias.

Verificamos, pela primeira vez, diminuição significativa da expressão do receptor da IL-17A nos pacientes DM1A em relação aos controles, tanto em linfócitos T CD3+ ($p=0,041$) quanto em T CD4+ ($p=0,0019$). Este resultado se deveu à menor quantidade de células T CD3+ e CD4+ que o expressavam, e não à redução na quantidade de receptores por célula, avaliada pela MFI ($p= 0,086$). A expressão desse receptor não se correlacionou com a resposta humoral (níveis de autoanticorpo anti – GAD ou anti IA2). Portanto, em nossa casuística, a expressão dos receptores de interleucina IL-17 não influenciou os títulos de autoanticorpos pancreáticos encontrados nos pacientes com DM1A. Estudos em animais verificaram que a IL-17 medeia a diferenciação de linfócitos B e a recombinação de imunoglobulinas⁵⁹. A redução da IL-17 e de seu receptor pode ter repercutido na ausência de correlação observada com os autoanticorpos.

Com o intuito de analisarmos outras repercussões da diminuição da expressão de IL-17RA na imunidade em DM1A, correlacionamos a expressão de IL-17RA em linfócitos T CD3+ e TCD4+ com o do número de células T regulatórias dos pacientes e controles normais (determinação realizada por Crisostomo LG (dados não apresentados). Sabe-se que a ativação da via Th17 inibe a das células TCD4⁺CD25^{high}, que são as células T regulatórias⁶¹ e a menor expressão de seu receptor poderia repercutir na presença destas células, mas esta relação não foi observada.

Estes dados são inéditos na literatura, porém são contrários aos observados em modelos animais de DM1A ou de outras doenças autoimune, Portanto, não podemos afastar a possibilidade de que a função deste receptor em humanos seja diferente de sua ação em modelos animais. Por outro lado, à semelhança dos nossos resultados, Crisostomo L et al (dados não apresentados) observaram diminuição da expressão de receptores da IL-21 (citocina ativadora da via Th17) em linfócitos T CD3+ e CD4+ em pacientes com diabetes tipo 1 de início recente. Também estes autores não observaram redução na expressão de IL-21R em linfócitos T CD8+, que são os efetores finais da destruição das células beta.

Assim, é possível que por termos estudados células da periferia (linfócitos T circulantes) e não diretamente as células das ilhotas pancreáticas (tecido-alvo do processo autoimune), tenhamos obtido valores diminuídos da expressão de IL-17A e do seu receptor IL-17RA, visto que a periferia pode não espelhar o ambiente inflamatório presente no sítio-alvo do processo autoimune. Há, ainda, a possibilidade de que na periferia ocorra um processo de retroalimentação negativa destes receptores, na tentativa de proteção do organismo contra o processo inflamatório autoimune em atividade.

Considerando ainda que a hiperglicemia ou alterações metabólicas poderiam ter interferido na expressão de IL-17RA em linfócitos periféricos, correlacionamos a expressão de IL-17RA com as medidas de glicemia e HbA1c, e não observamos sua influência nestes parâmetros.

Não podemos afastar a possibilidade da diminuição da expressão IL-17RA estar relacionada ao uso de insulina exógena e sua ação anti - inflamatória⁶⁰, mas o tratamento com insulina também esteve presente em outros estudos com DM1A onde havia ativação da via Th17.

Concluindo, nossos dados não sugerem que polimorfismos no gene da IL-17A ou a sua expressão na periferia estejam relacionados ao processo do DM1A.

O estudo dos efeitos da IL-17 A na gênese e nas manifestações clínicas do DM1A no homem evidenciou :

- 1) Três novas variantes alélicas no gene da IL-17 A.
- 2) Polimorfismos no gene da IL-17 não parecem estar implicados na predisposição ao diabetes autoimune no homem .
- 3) A redução da concentração de IL-17 A e da expressão dos seus receptores em linfócitos T CD3+ e CD4+ sugerem que a via Th17 não está ativada na periferia em pacientes com DM1A de início recente.
- 4) Estas determinações não foram dependentes das alterações metabólicas do diabetes e nem implicadas na expressão dos autoanticorpos.

No entanto, não descartamos a possibilidade de que, ao estudarmos variáveis na periferia e não do local de agressão imune (as ilhotas pancreáticas), tenhamos obtido valores que não expressem o processo adequadamente.

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

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 04/06/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0221/08**, intitulado: "**ESTUDO DO GENE DA IL-17A E DE SEU RECEPTOR EM CÉLULAS MONONUCLEARES PERIFÉRICAS EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 1 AUTOIMUNE**" versão maio 2007, 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: **Jéssica Pereira Fores**

CAPPesq, 05 de Junho de 2008

Prof. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça
Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
Disciplina de Endocrinologia
Departamento de Clínica Médica-FMUSP

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

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

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

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

ENDEREÇO Nº

..... APTO:

BAIRRO: CIDADE

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD

(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

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

2-PESQUISADOR: Dra.Maria Elizabeth Rossi da Silva

CARGO/ FUNÇÃO:Médica
Nº 19.981

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA

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

9. Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;
10. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
11. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
12. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

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

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

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

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

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: Dados laboratoriais dos pacientes diabéticos. AC Anti GAD65 expresso em Ui/ml (normal até 0,8). anti-IA2 expresso em Ui/ml (normal até 0,5). Glicemia em mg/dl e HbA1C em %.

DM1A	Glicemia	HbA1C	Anti-GAD65	Anti-IA2	DRB1	DRB2
1DM	291	5,92	0,9	0,04	3	4
2DM	392	7,52	0	0	13	8
3DM			0,35	0	4	14
4DM	105	7,00	0,85	0,46	4	13
5DM	70	5,76	0	1,95	4	4
6DM	108	5,92	91,1	26,2	13	16
7DM	87	9,60	0,9	0,7	3	4
8DM	180	8,32	22,8	36,9	1	4
9DM	180	8,56	2,2	1,5	7	8
10DM	377	7,76	2	3,1	9	14
11DM	169	7,76	0	0,3	3	1
12DM	159	5,20	13,2	0	16	16
13DM	126	9,52	0,3	0,1	3	4
14DM	203	11,84	22,5	2,7	7	13
15DM	153	8,16	0,4	1,4	3	4
16DM	80	7,52	1,4	0,3	4	8
3DM	239	7,52	113,1	0	3	13
18DM	136	5,36	0,3	0,6	7	12
19DM	257	10,96	0	0,1	3	3
20DM	82	6,00	0,1	2,1	4	8
21DM	43	6,48	0,7	0,4	3	4
22DM	71	10,48	0	0	1	9
23DM	200	9,68	3,2	0	3	4
24DM	330	10,64	0,6	0	3	4
25DM	197	6,00	27,1	0	7	16
26DM	163	10,08	0,09	0	3	4
27DM	207	5,36	2,11	0,09	3	1
28DM	270	9,68	6,5	44,55	7	8
29DM	123	5,60	0,09	0,26	4	11
30DM	51	6,32	0,21	0	8	16
31DM	85	11,28	0	0,21	7	7
32DM	286	6,72	0,8	1,51	3	3
33DM	71	4,40	56,1	0,23	1	13
34DM	127	9,36	0,52	0	1	13
35DM	138	9,52	12	14,9	3	4
36DM	83	8,72	1,5	2,1	3	3
37DM	43	6,32	0	0	3	3
38DM		10,16	31,2	15,6	7	8
39DM	286	10,6	11,9	0	1	13
40DM	134	7,12	0,6	0,8	3	4
41DM	354	6,56	0,1	0	3	4

ANEXO 3 (continuação): Dados laboratoriais dos pacientes diabéticos. AC Anti GAD65 expresso em Ui/ml (normal até 0,8). anti-IA2 expresso em Ui/ml (normal até 0,5). Glicemia em mg/dl e Hba1C em %.

DM1A	Glicemia	HbA1C	Anti-GAD65	Anti-IA2	DRB1	DRB2
42DM	319	6,40	0	0	4	11
43DM	235	5,20	0	0	7	8
44DM	351	8,4			3	8
45DM	375	8,88	2,5	1,6	3	4
46DM	165	6,7	1,4	0,4	4	4
47DM	206	7,84	0	0	3	7
48DM	229	5,84	2,3	0,5	3	4
49DM	301	7,20	0	0,7	3	4
50DM	95	6,40	46,1	1,4	3	10
51DM	235	6,48	4	10,1	4	11
52DM	238	4,88	0	1,4	1	9
53DM	245	9,20			3	4
54DM	243	7,8	1	0	7	7
55DM	218	10,10	13,1	19,95	9	11
56DM	112	8,80	0,49	0,1	3	1
57DM	107	7,30	0	0,6	3	4
58DM	115	9,20	0,88	23,3	3	9
59DM		12,20	1,8	19,5	3	4
60DM	207	9,9			3	4
61DM	186	11,30	0,2	0,3	4	13
62DM	187	8,50	34,9	0	3	4
63DM	95	14,60	0	0,42	4	8
64DM	245	13,50	0,42	0	3	9
65DM	66	11,90	0,59	0	3	9
66DM	311	9,60	0,14	0	4	13
67DM	225	8,40	0,34	2	3	4
68DM	78	8,60	0		3	4
69DM	59	8,60	0,5	0	3	4
70DM	300		0,2	0,52	3	16
71DM		7,30	1,07	9,77	4	16
72DM	205	9,20	9,1	7,74	3	3
73DM	183	7,70	61,2	0,1	3	3

ANEXO 3 (continuação): Dados laboratoriais dos pacientes diabéticos. AC Anti GAD65 expresso em Ui/ml (normal até 0,8). anti-IA2 expresso em Ui/ml (normal até 0,5). Glicemia em mg/dl e Hba1C em %.

DM1A	Glicemia	HbA1C	Anti-GAD65	Anti-IA2	DRB1	DRB2
74DM	113	6,40			3	4
75DM		5,20	10,2	0,21	3	3
76DM	126	7,4	56,3	11,9	3	1
77DM	72	8,88	28,3	45,1	4	4
78DM	106	8,7	1,82	0,21	4	13
79DM	69	7,84	0,42	2,7	4	13
80DM	138	5,84	53,5	1,07	3	8
81DM	146	7,20	0,74	27,9	1	4
82DM	98	6,40	34,4	3,2	1	4
83DM	69	6,48	0,7	16,4	1	4
84DM	128	4,88	0,6	11,6	1	4
85DM	84	9,20	7,2	7,9	3	3
86DM	58	11,8	0,1	8,2	4	8
87DM	56	10,10	25,8	10,7	3	4
88DM	89	8,80	13,3	27,5	4	11
89DM	231	7,30	0	0,4	3	4
90DM	134	9,20	8	11,4	4	11
91DM	162	12,20	9,5	0	3	7
92DM	372	9,9	0,7	1,1	3	9
93DM	61	11,30	15,6	0,1	1	8
94DM	82	8,50	50,4	5,9	3	4
95DM	44	14,60	12,9	0	4	7
96DM	316	13,50	0,4	0,4	7	8
97DM	352	11,90	0,3	0,5	3	9
98DM	325	9,60	2	0,21	3	4
99DM	95	8,40	1,3	9,2	3	4
100DM	149	8,60	4,44	7,8	3	3
101DM	103	8,60	2,13	15,11	3	4
102DM	313	61	26,2	8,08	3	3
103DM	91	7,30	6,32	2,73	3	3

ANEXO 4: Dados laboratoriais dos controles. AC Anti GAD65 expresso em Ui/ml (normal até 0,8). anti-IA2 expresso em Ui/ml (normal até 0,5). Glicemia em mg/dl e HbA1C em %.

Controles	Glicemia	HbA1C	Anti-GAD65	Anti-IA2	DRB1	DRB2
1C	80	5,36	0,00	0	3	11
2C	78	6,00	0,00	1	1	16
3C	87	5,04	0,00	0	4	13
4C	91	4,40	0,00	0	4	10
5C	66	5,52	0,00	0,1	7	8
6C	91	5,60	0,00	0,2	3	7
7C	90	5,36	0,00	0,1	1	13
8C	88	4,96	0,00	0,1	11	16
9C	98	4,24	0,00	0	4	15
10C	81	4,32	0,10	0,1	7	8
11C	87	4,80	0,30	0,3	7	16
12C	67	5,28	0,00	0,2	8	13
13C	79	5,28	0,10	0	4	13
14C	75	6,00	0,10	0,2	1	11
15C	77	5,28	0,30	0,3	4	15
16C	79	5,76	0,00	0,2	3	15
17C	76	5,36	0,06	0,09	7	15
18C	81	4,96	0,00	0,2	1	16
19C	66	4,48	0,00	0,2	4	14
20C	63	6,40	0,00	0,2	1	7
21C	54	6,16	0,00	0	3	4
22C	66	6,32	0,00	0,1	7	14
23C	80	5,92	0,00	0,2	3	10
25C	85	5,68	0,00	0,36	3	7
25C	72	5,68	0,10	0	3	13
26C	68	4,48	0,00	0,2	3	4
27C	75	5,12	0,00	0	13	15
28C	68	5,84	0,00	0	7	8
29C	74	5,84	0,00	0	1	9
30C	69	5,28	0,00	0	1	16
31C	84	6,24	0,00	0	13	14
32C	85	5,76	0,00	0	11	13
33C	76	4,72	0,00	0	11	16
34C	89	6,16	0,00	0	4	13
35C	79	5,68	0,00	0	11	16
36C	91	4,40	0,00	0	1	16
37C	92				7	13
38C	94	5,30	0,10	0	1	11
39C	87	5,00	0,10	0	13	14
40C	84	5,20	0,07	0	1	7
41C	81	5,20	0,08	0	3	13

ANEXO 4 (continuação): Dados laboratoriais dos controles. AC Anti GAD65 expresso em Ui/ml (normal até 0,8). anti-IA2 expresso em Ui/ml (normal até 0,5). Glicemia em mg/dl e HbA1C em %.

Controles	Glicemia	HbA1C	Anti-GAD65	Anti-IA2	DRB1	DRB2
42C	93	5,30	0,00	0,1	8	11
43C	78	5,30	0,00	0,1		
44C	79		0,00	0,2	12	12
45C	85		0,00	0,1		
46C	78		0,00	0,1	3	13
47C	70	5,50	0,06	0	4	15
48C		5,80	0,00	0	3	3
49C	71	5,40	5,00	0	15	15
50C	74	4,80	0,00	0	4	11
51C	72	5,10	0,00	0	3	15
52C	80	5,50	0,10	0,1	4	13
53C	77	5,20	0,20	0	3	8
54C	80	5,50	0,09	0,13		
55C	76		0,10	0		
56C	74		0,50	0		
57C	66		0,20	0		
58C	70		0,10	0		
59C	70		0,00	0		
60C	88		0,00	0		
61C	98		0,10	0		
62C	79		0,00	0		
63C	75		0,10	0		
64C	58		0,00	0,1		
65C	69		0,10	0,05		
66C	80		0,50	0,1		
67C	89		0,00	0		
68C	77		0,00	0,14		

ANEXO 4 (continuação): Dados laboratoriais dos controles. AC Anti GAD65 expresso em Ui/ml (normal até 0,8). anti-IA2 expresso em Ui/ml (normal até 0,5). Glicemia em mg/dl e HbA1C em %.

Controles	Glicemia	HbA1C	Anti-GAD65	Anti-IA2	DRB1	DRB2
69C	91		0,00	0	3	7
70C	98		0,00	0	3	16
71C	81		0,00	0,2	7	13
72C	79		0,10	0,3	13	13
73C	92		0,70	0	1	11
78C	90	5,40	0,00	0,3	4	7
79C	95		0,00	0,5	7	11
80C	81	5,20	0,00	0,7	18	1
81C	79	5,40	0,22	0,5	7	16
82C	83	5,90	0,20	0	4	10
83C	82	5,40	0,3	0,75	8	16
84C	92	5,20	0,23	0,18	1	7
85C	85		0,10	0,52	4	15
86C	83	4,40	0,11	0	13	13
87C	83		0,00	0	8	13
88C	76		0,00	0,18	1	8
89C	82		0,18	0	3	11
90C	85		0,19	0,53	4	16
91C	89		0,05	0,23	7	11
92C	91		0,00	0	3	16
93C	78		0,09	0,2	7	13
94C	83		0,10	1,6	1	7
95C	87		0,16	0	10	16
96C	83		0,00	0	4	11
97C	71		0,07	0,2	3	13
98C	81			0,26	7	14
99C					4	15
100C	67		0,20		13	16
101C		5,36		0	3	11
102C	82	5,04		0,2	4	15

ANEXO 5: Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte1).

DM1A	rs2275913	rs8193037	rs17879568	EXON 1	rs3819025	rs8193038	EXON 2
1DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
2DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
3DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
4DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
5DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
6DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
7DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
8DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
9DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
10DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
11DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
12DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
13DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
14DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
15DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
16DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
17DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
18DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
19DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
20DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
21DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
22DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
23DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
24DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
25DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
26DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
27DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
28DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
29DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
30DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
31DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
32DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
33DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
34DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
35DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
36DM	GG	GG	GG	NORMAL	AA	AA	NORMAL
37DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
38DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
39DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
40DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
41DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
42DM	GG	GA	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
43DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL

ANEXO 5: Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte1).

DM1A	rs2275913	rs8193037	rs17879568	EXON 1	rs3819025	rs8193038	EXON 2
44DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
45DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
46DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
47DM	GG	GA	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
48DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
49DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
50DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
51DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
52DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
53DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
54DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
55DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
56DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
57DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
58DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
59DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
60DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
61DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
62DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
63DM	AA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
64DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
65DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
66DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
67DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
68DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
69DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
70DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
71DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
72DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
73DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
74DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL

ANEXO 5: Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 1)

DM1A	rs2275913	rs8193037	rs17879568	EXON 1	rs3819025	rs8193038	EXON 2
75DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
76DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
77DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
78DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
79DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
80DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
81DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
82DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
83DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
84DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
85DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
86DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
87DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
88DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
89DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
90DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
91DM	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
92DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
93DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
94DM	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
95DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
96DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
97DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
98DM	GA	GA	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
99DM	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
100DM	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
101DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
102DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
103DM	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 2)

EXON 3 e							
DM1A	rs17881747	rs17880588	rs17878530	rs7747909	c.*911T>C	rs17886754	c.*1116C>T
1DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
2DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
3DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
4DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
5DM	CC	GG	CC	AA	TT	CC	CC
6DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
7DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
8DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
9DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
10DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
11DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
12DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
13DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
14DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
15DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
16DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
17DM	CC	GG	CC	AA	TT	CC	CC
18DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
19DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
20DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
21DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
22DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
23DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
24DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
25DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
26DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
27DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
28DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
29DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
30DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
31DM	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
32DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
33DM	CC	GA	CC	GG	TT	CC	CC
34DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
35DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
36DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
37DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
38DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
39DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
40DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
41DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
42DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 2)

EXON 3 e							
DM1A	rs17881747	rs17880588	rs17878530	rs7747909	c.*911T>C	rs17886754	c.*1116C>T
43DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
44DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
45DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
46DM	CC	GG	CC	GG	CT	CC	CC
47DM	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
48DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
49DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
50DM	CC	GG	CC	AA	TT	CC	CC
51DM	CC	GG	CC	AA	TT	CC	CC
52DM	CT	GG	CC	GA	TT	CC	CC
53DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
54DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
55DM	CT	GG	CC	GG	CT	CC	CC
56DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
57DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
58DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
59DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
60DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
61DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
62DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
63DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
64DM	CC	GA	CC	GG	TT	CC	CC
65DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
66DM	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
67DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
68DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
69DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
70DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
71DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
72DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
73DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
74DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
75DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
76DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
77DM	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
78DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
79DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
80DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
81DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
82DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
83DM	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
84DM	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 2)

DM1A	EXON 3 e						
	rs17881747	rs17880588	rs17878530	rs7747909	c.*911T>C	rs17886754	c.*1116C>T
85DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
86DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
88DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
89DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
90DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
91DM	CC	GG	CC	AA	TT	CC	CC
92DM	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
93DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
94DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
95DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
96DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
97DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
98DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
99DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
100DM	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
101DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
102DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
103DM	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 3)

DM1A	rs11351315	c.*1184G>C	rs17883570	rs1974226	rs3748067
1DM	TT	GG	TT	CT	CC
2DM	TT	GG	TT	CT	CC
3DM	TT	GG	TT	CC	CC
4DM	TT	GG	TT	CC	CC
5DM	TT	GG	TT	CC	CC
6DM	TT	GG	TT	CC	CC
7DM	TT	GG	TT	CT	CC
8DM	TT	GG	TT	CC	CC
9DM	TT	GG	TT	CC	CC
10DM	TT	GG	TT	CC	CC
11DM	TT	GG	TT	CC	CC
12DM	TT	GG	TT	CT	CT
13DM	TT	GG	TT	CC	CC
14DM	TT	GG	TT	CC	CC
15DM	TT	GG	TT	CT	CC
16DM	TT	GG	TT	CT	CC
17DM	TT	GG	TT	CC	CC
18DM	TT	GG	TT	CT	CC
19DM	TT	GG	TT	CC	CC
20DM	TT	GG	TT	CC	CC
21DM	TT	GG	TT	CC	CC
22DM	TT	GG	TT	CC	CC
23DM	TT	GG	TT	CT	CC
24DM	TT	GG	TT	CC	CC
25DM	TT	GG	TT	CC	CC
26DM	TT	GG	TT	CC	CT
27DM	TT	GG	TT	CC	CC
28DM	TT	GG	TT	CC	CC
29DM	TT	GG	TT	CC	CC
30DM	TT	GG	TT	CC	CT
31DM	TT	GG	TT	CC	CC
32DM	TT	GG	TT	CC	CT
33DM	TT	GG	TT	CC	CC
34DM	TT	GG	TT	CC	CC
35DM	TT	GG	TT	CC	CC
36DM	TT	GG	TT	CC	CC
37DM	TT	GG	TT	TT	CC
38DM	TT	GG	TT	CT	CC
39DM	TT	GG	TT	CC	CT
40DM	TT	GG	TT	CC	CC
41DM	TT	GG	TT	CC	CC
42DM	TT	GG	TT	CC	CC

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 3)

DM1A	rs11351315	c.*1184G>C	rs17883570	rs1974226	rs3748067
43DM	TT	GG	TT	CC	CC
44DM	TT	GG	TT	CT	CC
45DM	TT	GC	TT	CC	CC
46DM	TT	GG	TT	CC	CC
47DM	TT	GG	TT	CC	CC
48DM	TT	GG	TT	CT	CT
49DM	TT	GG	TT	CT	CC
50DM	TT	GG	TT	CC	CC
51DM	TT	GG	TT	CC	CC
52DM	TT	GG	TT	CC	CC
53DM	TT	GG	TT	CC	CC
54DM	TT	GC	TT	CC	CC
55DM	TT	GG	TT	CC	CC
56DM	TT	GG	TT	CT	CC
57DM	TT	GG	TT	CC	CC
58DM	TT	GG	TT	CC	CC
59DM	TT	GG	TT	CT	CC
60DM	TT	GG	TT	CT	CC
61DM	TT	GG	TT	CT	CC
62DM	TT	GG	TT	CC	CC
63DM	TT	GG	TT	CC	CC
64DM	TT	GG	TT	CC	CC
65DM	TT	GG	TT	CT	CC
66DM	TT	GG	TT	CC	CC
67DM	TT	GG	TT	CC	CC
68DM	TT	GG	TT	CT	CC
69DM	TT	GG	TT	CC	CT
70DM	TT	GG	TT	CT	CC
71DM	TT	GG	TT	CC	CC
72DM	TT	GG	TT	CC	CC
73DM	TT	GG	TT	CC	CC
74DM	TT	GG	TT	CC	CC

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 3)

DM1A	rs11351315	c.*1184G>C	rs17883570	rs1974226	rs3748067
75DM	TT	GG	TT	CT	CC
76DM	TT	GG	TT	CC	CC
77DM	TT	GG	TT	CC	CC
78DM	TT	GG	TT	CC	CC
79DM	TT	GG	TT	CC	CC
80DM	TT	GG	TT	CT	CC
81DM	TT	GG	TT	CC	CC
82DM	TT	GG	TT	CC	CC
83DM	TT	GG	TT	CT	CC
84DM	TT	GG	TT	CT	CC
85DM	TT	GG	TT	CC	CC
86DM	TT	GG	TT	CC	CC
87DM	TT	GG	TT	CC	CC
88DM	TT	GG	TT	CT	CC
89DM	TT	GG	TT	CC	CC
90DM	TT	GG	TT	CC	CC
91DM	TT	GG	TT	CC	CC
92DM	TT	GG	TT	CC	CC
93DM	TT	GG	TT	CC	CC
94DM	TT	GG	TT	CC	CC
95DM	TT	GG	TT	TT	CC
96DM	TT	GG	TT	CC	CC
97DM	TT	GG	TT	CC	CC
98DM	TT	GG	TT	CC	CC
99DM	TT	GG	TT	CT	CC
100DM	TT	GG	TT	CT	CC
101DM	TT	GG	TT	CC	CT
102DM	TT	GG	TT	CC	CC
103DM	TT	GG	TT	CC	CT

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 1)

Controles	rs2275913	rs8193037	rs17879568	EXON 1	rs3819025	rs8193038	EXON 2
1C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
2C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
3C	GA	GA	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
4C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
5C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
6C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
7C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
8C	GG	GA	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
9C	GA	GA	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
10C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
11C	GG	GG	GG	NORMAL	AA	AA	NORMAL
12C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
13C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
14C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
15C	AA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
16C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
17C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
18C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
19C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
20C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
21C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
22C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
23C	GG	GG	GG	NORMAL	AA	AA	NORMAL
25C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
25C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
26C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
27C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
28C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
29C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
30C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
31C	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
32C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
33C	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
34C	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
35C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
36C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
37C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
38C	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
39C	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
40C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
41C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
42C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
43C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 1)

Controles	rs2275913	rs8193037	rs17879568	EXON 1	rs3819025	rs8193038	EXON 2
44C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
45C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
46C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
47C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
48C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
49C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
50C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
51C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
52C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
53C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
54C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
55C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
56C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
57C	AA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
58C	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
59C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
60C	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
61C	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
62C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
63C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
64C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
65C	GG	GA	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
66C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
67C	GG	GA	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
68C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
69C	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
70C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
71C	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
72C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
73C	GA	GG	GA	NORMAL	GG	AA	NORMAL
74C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
75C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
76C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
77C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
78C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
79C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
80C	AA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 1)

Controles	rs2275913	rs8193037	rs17879568	EXON 1	rs3819025	rs8193038	EXON 2
81C	GG	GG	GA	NORMAL	GG	AA	NORMAL
82C	GG	GA	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
83C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
84C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
85C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
86C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
87C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
88C	GA	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL
89C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
90C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
91C	GG	GG	GA	NORMAL	GA	AA	NORMAL
92C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
93C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
94C	GG	GA	GG	NORMAL	GG	GA	NORMAL
95C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
96C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
97C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
98C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
99C	GG	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
100C	GA	GG	GG	NORMAL	GG	AA	NORMAL
101C	GG	GG	GG	NORMAL	GA	AA	NORMAL

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 2)

Controles	rs1788 1747	EXON 3 e rs17880588	rs178785 30	rs774 7909	c.*911T>C	rs17886 754	c.*1116C>T
1C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
2C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
3C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
4C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
5C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
6C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
7C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
8C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
9C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
10C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
11C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
12C	CC	GG	CC	GG	CT	CC	CC
13C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
14C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
15C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
16C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
17C	CC	GG	CC	AA	TT	CC	CT
18C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
19C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
20C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
21C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
22C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
23C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
25C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
25C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
26C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
27C	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
28C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
29C	CT	GG	CC	GA	TT	CC	CC
30C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
31C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
32C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
33C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
34C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
35C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
36C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
37C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
38C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
39C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
40C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
41C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
42C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 2)

Controles	rs178 81747	EXON 3 e rs17880588	rs178785 30	rs774 7909	c.*911T>C	rs17886 754	c.*1116C> T
43C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
44C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
45C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
46C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
47C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
48C	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
49C	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
50C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
51C	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
52C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
53C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
54C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
55C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
56C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
57C	CC	GG	CC	AA	TT	CC	CC
58C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
59C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
60C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
61C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
62C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
63C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
64C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
65C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
66C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
67C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
68C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
69C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
70C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
71C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
72C	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
73C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
74C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
75C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
76C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
77C	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
78C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
79C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
80C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
81C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
82C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 2)

Controles	rs178817 47	EXON 3 e rs1788058 8	rs1787853 0	rs774790 9	c.*911T> C	rs1788675 4	c.*1116C> T
83C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
84C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
85C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
86C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
87C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
88C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
89C	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
90C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
91C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
92C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
93C	CT	GA	CC	GG	TT	CC	CC
94C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
95C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
96C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
97C	CC	GG	CC	GG	TT	CC	CC
98C	CT	GG	CC	GG	TT	CC	CC
99C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
100C	CC	GG	CC	GA	TT	CC	CC
101C	CT	GG	CC	GA	TT	CC	CC

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 3)

Controles	rs11351315	c.*1184G>C	rs17883570	rs1974226	rs3748067
1C	TT	GG	TT	CC	CT
2C	TT	GG	TT	CC	CC
3C	TT	GG	TT	CC	CC
4C	TT	GG	TT	TT	CC
5C	TT	GG	TT	CC	CC
6C	TT	GG	TT	CT	CC
7C	TT	GG	TT	CT	CT
8C	TT	GG	TT	CT	CC
9C	TT	GG	TT	CC	CC
10C	TT	GG	TT	CC	CC
11C	TT	GG	TT	CC	CC
12C	TT	GG	TT	CC	CC
13C	TT	GG	TT	CC	CC
14C	TT	GG	TT	CC	CC
15C	TT	GG	TT	CC	CC
16C	TT	GG	TT	CC	CC
17C	TT	GG	TT	TT	CC
18C	TT	GG	TT	CC	CC
19C	TT	GG	TT	TT	CC
20C	TT	GG	TT	CC	CC
21C	TT	GG	TT	CC	CC
22C	TT	GG	TT	CT	CC
23C	TT	GG	TT	CC	CC
25C	TT	GG	TT	CT	CC
25C	TT	GG	TT	CT	CT
26C	TT	GG	TT	CT	CT
27C	TT	GG	TT	CC	CC
28C	TT	GG	TT	CT	CT
29C	TT	GG	TT	CC	CC
30C	TT	GG	TT	CC	CC
31C	TT	GG	TT	CC	CC
32C	TT	GG	TT	CC	CT
33C	TT	GG	TT	CC	CC
34C	TT	GG	TT	CC	CC
35C	TT	GG	TT	TT	CC
36C	TT	GG	TT	CC	CC
37C	TT	GG	TT	CC	CC
38C	TT	GG	TT	CC	CC
39C	TT	GG	TT	CC	CC
40C	TT	GG	TT	CC	CC
41C	TT	GG	TT	CC	CC
42C	TT	GG	TT	CT	CC

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 3)

Controles	rs11351315	c.*1184G>C	rs17883570	rs1974226	rs3748067
43C	TT	GG	TT	CC	CC
44C	TT	GG	TT	CT	CC
45C	TT	GG	TT	CC	CC
46C	TT	GG	TT	CT	CC
47C	TT	GG	TT	CC	CC
48C	TT	GC	TT	CC	CC
49C	TT	GG	TT	CC	CC
50C	TT	GG	TT	CT	CC
51C	TT	GG	TT	TT	CC
52C	TT	GG	TT	CC	CC
53C	TT	GG	TT	CC	CC
54C	TT	GG	TT	TT	CC
55C	TT	GG	TT	CC	CT
56C	TT	GC	TT	CC	CC
57C	TT	GG	TT	CC	CC
58C	TT	GG	TT	CC	CC
59C	TT	GG	TT	CT	CC
60C	TT	GG	TT	CC	CC
61C	TT	GG	TT	CC	CC
62C	TT	GG	TT	CC	CC
63C	TT	GG	TT	CT	CC
64C	TT	GG	TT	CT	CC
65C	TT	GG	TT	CC	CC
66C	TT	GG	TT	CC	CC
67C	TT	GG	TT	CC	CT
68C	TT	GG	TT	CC	CT
69C	TT	GG	TT	CC	CC
70C	TT	GG	TT	CT	CC
71C	TT	GG	TT	CC	CC
72C	TT	GG	TT	CC	CC
73C	TT	GG	TT	CC	CC
74C	TT	GG	TT	CC	CC
75C	TT	GG	TT	TT	CC
76C	TT	GG	TT	CT	CC
77C	TT	GG	TT	TT	CC
78C	TT	GG	TT	CC	CC
79C	TT	GG	TT	CT	CC
80C	TT	GG	TT	CC	CC
81C	TT	GG	TT	CC	CC
82C	TT	GG	TT	CT	CC
83C	TT	GG	TT	CC	CC
84C	TT	GG	TT	TT	CC

ANEXO 5 (continuação): Polimorfismos no gene da IL-17A em pacientes com DM1A e controles normais (parte 3)

Controles	rs11351315	c.*1184G>C	rs17883570	rs1974226	rs3748067
85C	TT	GG	TT	CC	CC
86C	TT	GG	TT	CC	CC
87C	TT	GG	TT	CC	CC
88C	TT	GG	TT	CC	CT
89C	TT	GG	TT	CC	CC
90C	TT	GG	TT	CC	CC
91C	TT	GG	TT	CC	CC
92C	TT	GG	TT	CC	CC
93C	TT	GG	TT	CC	CC
94C	TT	GG	TT	CC	CC
95C	TT	GG	TT	CC	CT
96C	TT	GG	TT	CC	CC
97C	TT	GG	TT	CC	CT
98C	TT	GG	TT	CT	CC
99C	TT	GG	TT	CC	CC
100C	TT	GG	TT	CC	CC
101C	TT	GG	TT	CC	CC

ANEXO 6: Valores de IL-17 sérica em pacientes com DM1A e controles, foram considerado dosáveis acima de 15pg/ml.

DM1A	IL-17 sérica
38DM	<15
78DM	<15
79DM	<15
80DM	<15
81DM	<15
82DM	<15
83DM	<15
84DM	<15
85DM	<15
86DM	<15
87DM	<15
88DM	<15
89DM	15,2
90DM	<15
91DM	<15
92DM	<15
93DM	<15
94DM	<15
95DM	<15
96DM	<15
97DM	<15
101DM	<15
102DM	<15
103DM	<15

ANEXO 6 (continuação): Valores de IL-17 sérica em pacientes com DM1A e controles, foram considerado dosáveis acima de 15pg/ml.

Controles	IL-17 sérica
44C	24,6
46C	<15
47C	<15
49C	<15
50C	85,4
51C	<15
52C	<15
53C	<15
69C	15,2
70C	<15
71C	<15
72C	<15
73C	<15
74C	31,2
75C	<15
76C	<15
77C	<15
78C	<15
79C	16,1
80C	<15
81C	<15
101C	<15
102C	60

ANEXO 7: Expressão (%) do receptor da IL-17 (IL-17RA) em paciente com DM1A e indivíduos controles obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam IL-17RA)

DM1A	Linfócitos	CD3+	CD4+	CD8+	Expressão de IL-17RA em linfócitos T CD3+	Expressão de IL-17RA em linfócitos T CD4+	Expressão de IL-17RA em linfócitos T CD8+
38DM	2500	0,783	0,561	0,201	0,241	0,0989	0,134
78DM	2100	0,789	0,356	0,383	0,568	0,172	0,362
79DM	2600	0,785	0,438	0,308	0,174	0,123	0,0278
80DM	3200	0,652	0,387	0,266	0,15	0,0513	0,0915
81DM	2300	0,595	0,313	0,233	0,314	0,102	0,181
82DM	2100	0,761	0,498	0,231	0,263	0,104	0,141
83DM	4500	0,747	0,425	0,26	0,274	0,101	0,143
84DM	2500	0,756	0,449	0,257	0,183	0,104	0,0561
85DM	2800	0,69	0,488	0,204	0,206	0,108	0,0875
86DM	2800	0,534	0,306	0,184	0,232	0,112	0,0869
87DM	3500	0,704	0,483	0,203	0,429	0,197	0,212
88DM	2700	0,697	0,356	0,28	0,473	0,11	0,335
89DM	6000	0,537	0,31	0,189	0,557	0,217	0,297
90DM	2000	0,627	0,37	0,228	0,209	0,0121	0,197
91DM	2200	0,787	0,431	0,283	0,28	0,0743	0,205
92DM	2800	0,785	0,382	0,348	0,404	0,0895	0,309
93DM	2400	0,66	0,382	0,233	0,595	0,334	0,228
94DM	3200	0,739	0,43	0,277	0,521	0,276	0,231
95DM	2600	0,745	0,465	0,274	0,658	0,395	0,255
96DM	5200	0,723	0,485	0,228	0,517	0,356	0,176
97DM	1400	0,539	0,298	0,24	0,339	0,189	0,148
101DM	2200	0,758	0,359	0,384	0,442	0,197	0,237
102DM	2800	0,752	0,428	0,288	0,312	0,152	0,152
103DM	1800	0,688	0,297	0,36	0,28	0,101	0,164
Mediana	2600	0,731	0,406	0,258	0,313	0,111	0,1785
Percentil 5	1830	0,537	0,299	0,190	0,175	0,054	0,067
Percentil 95	5095	0,786	0,496	0,379	0,590	0,352	0,331

ANEXO 7 (continuação): Expressão (%) do receptor da IL-17 (IL-17RA) em paciente com DM1A e indivíduos controles obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam IL-17RA)

Controles	Linfócitos	CD3+	CD4+	CD8+	Expressão de IL-17RA em linfócitos T CD3+	Expressão de IL-17RA em linfócitos T CD4+	Expressão de IL-17RA em linfócitos T CD8+
44C	3800	0,73	0,485	0,218	0,194	0,111	0,0696
46C	1800	0,666	0,404	0,162	0,274	0,131	0,128
47C	1800	0,506	0,284	0,202	0,358	0,154	0,198
49C	2000	0,67	0,373	0,191	0,605	0,344	0,163
50C	3600	0,718	0,353	0,298	0,357	0,0947	0,252
51C	1600	0,663	0,377	0,223	0,286	0,109	0,16
52C	1800	0,738	0,471	0,24	0,357	0,161	0,192
53C	2400	0,768	0,352	0,253	0,65	0,303	0,202
69C	2200	0,648	0,312	0,301	0,479	0,228	0,235
70C	2300	0,523	0,266	0,221	0,436	0,237	0,18
71C	3800	0,644	0,39	0,251	0,432	0,271	0,169
72C	2500	0,738	0,391	0,285	0,459	0,258	0,177
73C	4000	0,663	0,36	0,281	0,435	0,233	0,191
74C	3900	0,555	0,359	0,178	0,475	0,326	0,14
75C	4400	0,622	0,391	0,195	0,386	0,252	0,117
76C	2700	0,63	0,413	0,212	0,545	0,334	0,209
77C	1700	0,655	0,29	0,317	0,361	0,169	0,172
78C	2300	0,688	0,345	0,298	0,463	0,228	0,217
79C	3596	0,755	0,344	0,291	0,413	0,327	0,085
80C	1827	0,734	0,46	0,235	0,482	0,323	0,143
81C	2979	0,701	0,482	0,204	0,459	0,342	0,114
101C	1200	0,706	0,467	0,206	0,58	0,377	0,176
102C	4900	0,805	0,504	0,278	0,917	0,565	0,334
Mediana	2400	0,67	0,377	0,235	0,436	0,252	0,176
Percentil 5	1610	0,5262	0,2846	0,1793	0,2752	0,1092	0,0879
Percentil 95	4360	0,7667	0,4847	0,3007	0,6455	0,3737	0,2503
Teste de Mann Whitney (p)	0,6017	0,1203	0,4005	0,2921	0,041	0,0019	0,6473

ANEXO 8: Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da interleucina 17 em linfócitos T periféricos de pacientes com DM1A e controles

DM1A	MFI para IL-17RA
38DM	4,95
78DM	60,24
79DM	4,58
80DM	2,93
81DM	6,26
82DM	6,00
83DM	7,81
84DM	6,87
85DM	4,80
86DM	10,34
87DM	16,36
88DM	28,07
89DM	38,39
90DM	3,333
91DM	6,730
92DM	15,18
93DM	40,25
94DM	15,16
95DM	41,22
96DM	58,81
97DM	13,02
101DM	15,11
102DM	7,28
103DM	
Mediana	10,34
Percentil 5	3,45
Percentil 95	57,05

ANEXO 8 (continuação): Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da interleucina 17 em linfócitos T periféricos de pacientes com DM1A e controles

Controles	MFI para IL-17RA
44C	3,86
46C	6,14
47C	14,45
49C	31,67
50C	10,90
51C	8,836
52C	11,17
53C	40,26
69C	19,97
70C	19,94
71C	15,18
72C	18,87
73C	18,49
74C	26,10
75C	13,41
76C	37,51
77C	19,960
78C	26,76
79C	
80C	16,64
81C	13,40
101C	25,48
102C	1019,64
Mediana	18,68
Percentil 5	6,27
Percentil 95	40,12
Teste de Mann Whitney (p)	0,0865

ANEXO 9: Correlação entre valores metabólicos (glicemia, HbA1c, anti-GAD65 e anti-IA2) e células T regulatórias com expressão do receptor da IL-17A em pacientes com DM1A

	Expressão de IL-17RA em linfócitos T periféricos CD3+		Expressão de IL-17RA em linfócitos T periféricos CD4+	
	p	r	p	r
Glicemia	0,82	-0,048	0,211	-0,270
HbA1c	0,60	0,11	0,680	0,090
Anti-GAD65	0,97	-0,005	0,95	-0,013
Anti-IA2	0,07	-0,371	0,10	-0,337
Células Tregs	0,403	0,232	0,138	0,401

r= Correlação de Spearman

1. Pugliese, A.; Eisenbarth, G. S. Type I Diabetes Mellitus of Man:Gen Susceptibility and Resistance. In: Eisenbarth, G. S. et al. Type I Diabetes Mellitus: Molecular, Cellular, and Clinical Immunology. 2002. Philadelphia
2. Silva ME, Mory D, Davini E. Genetic and humoral autoimmunity markers of type 1 diabetes: from theory to practice. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008 Mar;52(2):166-80.
3. Devendra D., Liu E., Eisenbarth G.S. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* 2004 Mar;328:750-754.
4. Pihoker C., et al. Autoantibodies in Diabetes. *Diabetes.* 2005 Dec; 54(2): 52-61.
5. Davini E, Silva MER, Alves LI, Correia MRS, Fukui RT, Latrônico AC, et al. O genótipo I/I do locus VNTR do gene da insulina confere risco independente para diabetes mellitus tipo 1 nos pacientes sem os genótipos DRB1 e DQB1 de susceptibilidade. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49 (Suppl 2):S876.
6. Alizadeh BZ, Koeleman BP. Genetic polymorphisms in susceptibility to type 1 diabetes. *Clin Chim Acta.* 2008;387(1-2):9-17
7. Windsor L. et al. Alleles of the IL12B 3'UTR associate with late onset of type 1 diabetes. *Hum. Immunol.* 2004 Dec;65 (12) 1432-1436.
8. Gamberini M, Correia MRS, Davini E, Alves L, Mainardi-Novo DTO, Miura I, et al. Associação do polimorfismo + 49 A/G no exon 1 do gene CTLA-4 com diabetes melito tipo 1 e suas apresentações clínicas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50:S180
9. Gebe JA, Unrath KA, Yue BB, Miyake T, Falk BA, Nepom GT. Autoreactive human T-cell receptor initiates insulitis and impaired glucose tolerance in HLA DR4 transgenic mice. *J Autoimmun.* 2008 Jun;30(4):197-206.
10. Brenner D. et al. Concepts of activated T cell death. *Clinical Reviews in Oncology Hematology* 2008 Apr; 66(1): 52-64.
11. Liston A, Lesage S, Gray DH, O'Reilly LA, Strasser A, Fahrner AM, Boyd RL, Wilson J, Baxter AG, Gallo EM, Crabtree GR, Peng K, Wilson

SR, Goodnow CC. Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity*. 2004 Dec;21(6):817-30.

12. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S52-61.

13. Mathis D, Benoist C. Back to central tolerance. *Immunity*. 2004 May;20(5):509-16.

14. Liston A, Lesage S, Gray DH, O'Reilly LA, Strasser A, Fahrner AM, Boyd RL, Wilson J, Baxter AG, Gallo EM, Crabtree GR, Peng K, Wilson SR, Goodnow CC. 14 Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity*. 2004 Dec;21(6):817-30.

15. Dosch H, Cheung RK, Karges W, Pietropaolo M, Becker DJ. Persistent T cell anergy in human type 1 diabetes. *J Immunol*. 1999 Dec 15;163(12):6933-40.

16. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*. 2003 Sep;4(9):835-42.

17. Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol*. 2007 Jun;19(3):320-6

18. Abbas AK, ed *cellular and molecular immunology*. 5th edition ed: saunders; 2008.

19. Bettelli E., Korn T., Kuchroo V K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007 Dec;19(6):652-7.

20. Korn T., Oukka M., Bettelli E. Th17 cells: Effector T cells with inflammatory properties. *Seminars in IMMUNOLOGY* 2007 Dec;19(6): 362–371.

21. Annuziato F., et al Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *JEM* 2007 Aug 6; 204(8): 1849-1861.

22. Mensah-Brown E.P. et al. IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin. *Eur. J. Immunol*. 2006; 36: 216-223.

23. Cooke A., Th17 Cells in Inflammatory Conditions. *The Review of Diabetic Studies*. 2006 Summer; 3(2): 72-75

24. O'Garra A, Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF-beta! *Nat Immunol.* 2008 Jun;9(6):588-90. 31
25. Zhu J., Paul W. E. CD4 T cells: fates, functions and faults. *Blood*, 2008; 112: 1557-1568.
26. Chen Z., Laurence A., O'Shea J J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Seminars in IMMUNOLOGY.* 2007. Dec; 19 (6):400-8
27. Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V K. Th17 cell in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature Immunology* 2007 Apr; 8(4): 345-350.
28. Nurieva R., et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 2007; 448(7152):480-3.
29. Wei L., Laurence A., Elias M K., O'Shea J J., IL-21 is produced by TH17 Cells and drives IL-17 promotion in a STAT3-dependent Manner. *The Journal of Biological Chemistry.* 2007 Nov 30; 282(48): 34605-34610.
30. Tesmer L. A., Lundy S. K., Sarkar S., Fox D.A. Th17 cells in human disease. *Immunological Reviews*, 2008; 223:87-113.
31. Aggarwal S., Gurney A.L. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *Journal of Leukocyte Biology.* 2002 Jan; 71(1): 1-8.
32. Gaffen S.L. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*, 2008; 43: 402-7.
33. Ivanov I I., Zhou L., Littman D R. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Semin Immunol* 2007 Dec;19(6):409-17.
34. Ghilardi N., Ouyang W., Targeting the development and effector functions of TH17 cells. *Semin Immunol* 2007; 19(6):383-393.
35. Gaffen S.L. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*, 2008; 43: 402-7.
36. Bettelli E., Korn T., Oukka M., Kuchroo V. K. Induction and effector functions of Th17cells. *Nature* 2008 Jun 19; 453(7198): 1051-1057.
37. Acosta-Rodriguez E.V., Napolitano G., Lanzavecchia A., Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor – β are essential for the differentiation of interleukin 17 – producing human T helper cells. *Nature Immunology.* 2007; 8:942-9.
38. Mills K.H.G. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J. Immunol.* 2008; 38: 2636-2649.

39. Matsushita S., Higash T. Human Th17 cell clones and Natural Immune Responses. *Allergy International* 2008 Jun; 57(2): 135-140.
40. MCGEACHY M J.; CUA D J. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):445-53.
41. Mojibian M, Chakir H, Lefebvre DE, Crookshank JA, Sonier B, Keely E, Scott FW. Diabetes-specific HLA-DR-restricted proinflammatory T-cell response to wheat polypeptides in tissue transglutaminase antibody-negative patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 2009 Aug;58(8):1789-96.
42. Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjo I, Ishibashi T, Yoshimura A, Yoshida H. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol*. 2006 Oct 15;177(8):5377-85.
43. Spolski R., et al. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. *PNAS*. 2008;105:14028-14033.
44. Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AM. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2009 Jun;58(6):1302-11.
45. Tartar DM, VanMorlan AM, Wan X, Guloglu FB, Jain R, Haymaker CL, Ellis JS, Hoeman CM, Cascio JA, Dhakal M, Oukka M, Zaghoulani H. FoxP3+RORgammat+ T helper intermediates display suppressive function against autoimmune diabetes. *J Immunol*. 2010 Apr 1;184(7):3377-85.
46. Gao X, Ding G, Wang Z, Fu H, Ni Z, Ma J, Song S, Liu F, Fu Z. Adjuvant treatment suppresses IL-17 production by T cell-independent myeloid sources in nonobese diabetic mice. *Mol Immunol*. 2010 Aug;47(14):2397-404.
47. Nikoopour E, Schwartz JA, Huszarik K, Sandrock C, Krougly O, Lee-Chan E, Singh B. Th17 polarized cells from nonobese diabetic mice following mycobacterial adjuvant immunotherapy delay type 1 diabetes. *J Immunol*. 2010 May 1;184(9):4779-88.
48. Han G, Wang R, Chen G, Wang J, Xu R, Wang L, Feng J, Li X, Guo R, Fu L, Shen B, Li Y. Interleukin-17-producing gammadelta+ T cells

protect NOD mice from type 1 diabetes through a mechanism involving transforming growth factor-beta. *Immunology*. 2010 Feb;129(2):197-206.

49. Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Førre ØT, Helgetveit K, Kvien TK, Lie BA. Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Apr;48(4):367-70.

50. Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T, Kamatani N, Kotake S. Associations between HLA-DRB1, RANK, RANKL, OPG, and IL-17 genotypes and disease severity phenotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2007 Dec;26(12):2137-41.

51. Boehm BO, Rosinger S, Sauer G, Manfras BJ, Palesch D, Schiekofer S, Kalbacher H, Burster T. Protease-resistant human GAD-derived altered peptide ligands decrease TNF-alpha and IL-17 production in peripheral blood cells from patients with type 1 diabetes mellitus. *Mol Immunol*. 2009 Aug;46(13):2576-84.

52. Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, Hafler DA. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J Immunol*. 2009 Oct 1;183(7):4432-9.

53. Marwaha AK, Crome SQ, Panagiotopoulos C, Berg KB, Qin H, Ouyang Q, Xu L, Priatel JJ, Levings MK, Tan R. Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J Immunol*. 2010 Oct 1;185(7):3814-8.

54. Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W, Evans JG, Cimaz R, Bajaj-Elliott M, Wedderburn LR. Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 17;107(33):14751-6.

55. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol*. 2008 Jun;127(3):385-93.

56. Surendar J, Aravindhan V, Rao MM, Ganesan A, Mohan V. Decreased serum interleukin-17 and increased transforming growth factor-beta

levels in subjects with metabolic syndrome (Chennai Urban Rural Epidemiology Study-95). *Metabolism*. 2010 Jul 27.

57. Arababadi MK, Nosratabadi R, Hassanshahi G, Yaghini N, Pooladvand V, Shamsizadeh A, Hakimi H, Derakhshan R. Nephropathic complication of type-2 diabetes is following pattern of autoimmune diseases? *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Jan;87(1):33-7.

58. Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim HJ, Korn T, Kolls JK, Cantor H, Bettelli E, Kuchroo VK. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 10;107(32):14292-7.

59. Rosa JS, Oliver SR, Mitsuhashi M, Flores RL, Pontello AM, Zaldivar FP, Galassetti PR. Altered kinetics of interleukin-6 and other inflammatory mediators during exercise in children with type 1 diabetes. *J Investig Med*. 2008 Apr;56(4):701-13.

60. Araki M, Chung D, Liu S, Rainbow DB, Chamberlain G, Garner V, Hunter KM, Vijayakrishnan L, Peterson LB, Oukka M, Sharpe AH, Sobel R, Kuchroo VK, Wicker LS. Genetic evidence that the differential expression of the ligand-independent isoform of CTLA-4 is the molecular basis of the Idd5.1 type 1 diabetes region in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2009 Oct 15;183(8):5146-57. Epub 2009 Sep 25.

61. Costa VS, Mattana TC, da Silva ME. Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Jun;88(3):222-6.