KARLA FABIANA BRASIL GOMES

**A influência da estratificação populacional na susceptibilidade
genética ao diabetes mellitus tipo 1 em uma população
brasileira**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva

**SÃO PAULO
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Gomes, Karla Fabiana Brasil

A influência da estratificação populacional na susceptibilidade genética ao diabetes mellitus tipo 1 em uma população brasileira / Karla Fabiana Brasil Gomes. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Elizabeth Rossi da Silva.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1 2.Predisposição genética para doença
3.Grupos populacionais 4.Genética populacional 5.Genética 6.Miscigenação

USP/FM/DBD-099/16

Dedicatória

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, que me manteve firme nesta
jornada de unir a função de médica atuante na atividade assistencial e
pesquisadora, e que, certamente, me ergueu a cada obstáculo e passo em
falso

A minha família querida, que, mesmo distante, me apoia constantemente no
aprimoramento da minha profissão

A minha orientadora, que, para mim, é um exemplo de dedicação,
persistência e obstinação

A minha querida tia, Maria Edoina (in memorian), pelo exemplo que foi em
vida e pela torcida desta, e de outras conquistas ao longo da minha
trajetória profissional

Ao meu querido marido, pelo amor dedicado e pela paciência em
compreender os momentos de ausência e dedicação aos estudos

Ao meu mais novo e maior projeto de vida, Valentina, que tem me ensinado o
verdadeiro significado da palavra amor

Agradecimentos

A minha família, pela ajuda a superar os obstáculos ao longo destes anos em que me dedico à minha profissão.

À Dra. Maria Elizabeth Rossi da Silva, que me acolheu com todo carinho e dedicou parte de seu tempo a me ensinar as ferramentas para realização deste projeto, e, acima de tudo, me ensinou a ser paciente e cuidadosa ao longo da realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Maria Rita Passos-Bueno, que gentilmente nos recebeu no laboratório de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para que realizássemos parte das análises deste estudo.

A todos aqueles que colaboraram na realização deste feito, em especial, ao Prof. Sergio Mاتيoli, Luciano Brito, Aritania Santos, Marcia Regina Correia, Cintia Semzezem, Rosa Fukui, Rodolfo Batista e Greci de Paula.

Aos demais funcionários e colegas do LIM-18, pelos bons momentos e pelo carinho com que me receberam.

Aos pacientes do Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, sem os quais seria impossível a realização deste.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio (LIM-18) e no Ambulatório de Diabetes da disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2012/14212-7.

Normatização adotada

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

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

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

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**LISTA DE SÍMBOLOS****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****RESUMO****ABSTRACT**

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	Patogênese do DM1A.....	03
1.2	Genética do DM1A.....	05
1.3	Determinantes genéticos de DM1A na nossa população.....	11
1.4	Raça e etnia.....	12
1.5	Estudos de Associação e as dificuldades geradas pela estratificação populacional.....	13
1.6	Marcadores população-específicos.....	14
1.7	Métodos empregados em estudos de genética de populações.....	17
2	JUSTIFICATIVA.....	18
3	OBJETIVOS.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1	Considerações Éticas.....	24
4.2	Casuística.....	24
4.2.1	Pacientes.....	24
4.2.2	Controles.....	25
4.3	Estudo Molecular.....	26
4.3.1	Genotipagem do sistema HLA DR-DQ (genérico e subtipagem).....	26
4.3.2	Genotipagem dos alelos de classe I e III do <i>locus VNTR</i> do	

gene da insulina.....	27
4.3.3 Genotipagem do <i>CTLA-4</i> . Polimorfismo +49A/G.....	28
4.3.4 Genotipagem dos AIMS (<i>Ancestrive Informative Markers</i>).....	28
4.3.5 Controle de qualidade das amostras e dos SNPs genotipados.....	30
4.4 Avaliação bioquímica.....	31
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5.1 Inferência da composição ancestral.....	36
5.2 Teste de associação.....	38
6 RESULTADOS.....	40
6.1 Estratégias do estudo.....	41
6.2 Características da população.....	41
6.3 Composição ancestral.....	43
6.4 Genes do Sistema HLA.....	46
6.5 <i>INS-VNTR</i> - <i>Locus</i> IDDM2; Cr 11p15.....	51
6.6 Polimorfismo do gene <i>PTPN22</i> - 1858CT; Cr 4q26.....	51
6.7 Polimorfismos A>G na posição +49 do Gene <i>CTLA4</i> ; Cr 2q33.....	52
6.8 Correção para efeitos de estratificação das variantes polimórficas dos genes <i>INS-VNTR</i> , <i>PTPN22</i> e <i>CTLA4</i> relacionados ao DM1 A.....	53
7 DISCUSSÃO.....	55
8 CONCLUSÃO.....	64
9 ANEXOS.....	66
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

Anti-21 OH	Anticorpo anti-21 hidroxilase
Anti-GAD65	Anticorpo anti-enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65
IAA	Anticorpo anti-insulina
ICA	Anticorpo anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático
Anti-IA2	Anticorpo anti-proteína de membrana com homologia às tirosina-fosfatases ou antiantígeno 2 do insulinoma
Anti-ZnT8	Anticorpo anti-transportador 8 do Zinco
AIMs	Marcadores informativos de ancestralidade
APC	Células apresentadoras de antígenos
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DM	Diabetes mellitus
DM1A	Diabetes mellitus autoimune tipo 1 A
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
GWAS	Estudos de associação genômica ampla (<i>Genome-Wide Association Study</i>)
HGDP	<i>Human Genome Diversity Panel</i>
HapMap	<i>Haplotype Map of Human Genome</i>
HLA	Antígeno leucocitário humano
HbA1c	Hemoglobina glicada
INF-γ	Interferon-gama
INS	Insulina
IDDM	Locus de susceptibilidade ao diabetes mellitus (<i>Insulin Dependent Diabetes Mellitus locus</i>)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NK	Células exterminadoras “ <i>natural killer</i> ”
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pep C	Peptídeo C
P	Valor de P
PTPN22	Proteína tirosina-fosfatase não receptor tipo 22
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

VNTR	Variação no número de repetições de nucleotídeos 5' do gene da insulina <i>(Variation number tandem repeat)</i>
STRAT	<i>Structure Association Test</i>
T CD8	Células T CD8 citotóxicas
T CD4	Células T CD4 helper
TDT	Teste de desequilíbrio de transmissão <i>(Transmission disequilibrium test)</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa

α	alfa
β	beta
γ	gama
mL	mililitro
ng	nanograma
n°	número
mg/ dL	miligrama por decilitro
mM	Milimol
ng/mL	nanograma por mililitro
ng/dL	nanograma por decilitro
ng/μL	nanograma por microlitro
U/mL	unidade por mililitro
°C	graus Celsius
I ¹²⁵	iodo 125
K	constante K

Tabela 1	Estudos de caracterização de populações baseados em marcadores de ancestralidade.....	16
Tabela 2	Dados demográficos dos pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles normais.....	42
Tabela 3	Características laboratoriais de pacientes portadores de diabetes tipo1A e controles normais.....	43
Tabela 4	Distribuição dos autoanticorpos pancreáticos em pacientes portadores de diabetes tipo1A e controles normais.....	43
Tabela 5	Contribuição de ascendência estimada nos grupos de pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles normais.....	44
Tabela 6	Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com diabetes tipo 1 A e controles normais	48
Tabela 7	Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles normais.....	49
Tabela 8	Distribuição dos genótipos HLA-DRB1/DRB1 de risco dos pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles normais.....	49
Tabela 9	Distribuição dos haplótipos HLA DRB1-DQB1 em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles normais.....	50
Tabela 10	Distribuição dos genótipos dos alelos classe I e classe III do <i>INS VNTR</i> em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles normais.....	51
Tabela 11	Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene <i>PTPN22</i> - 1858CT em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles normais.....	52
Tabela 12	Distribuição dos genótipos do polimorfismo rs231775A>G do gene <i>CTLA4</i> em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles normais...	52

Tabela 13	Freqüências genotípicas das variantes polimórficas relacionadas ao DM1A, estimadas para os pacientes e controles; p obtido a partir do teste de associação assumindo que não há estrutura populacional e após a correção para a estratificação.....	53
------------------	---	----

Figura 1	<i>Odds ratio</i> para uma série de “genes/ <i>loci</i> ” dos painéis de genoma recentes	06
Figura 2	Estrutura gênica do MHC humano, identificando os genes HLA de classe I (HLA-A, B e C), de classe II (HLA-DR, DQ e DP), e os de classe III.....	07
Figura 3	Interação do complexo da molécula HLA de classe II com peptídeo antigênico e o receptor da célula T.....	08
Figura 4	Representações gráficas das contribuições de ascendência individuais geradas pelo <i>software Structure</i> , assumindo $k = 3$ populações. A) <i>Bar plot</i> exibindo as contribuições Africana (vermelho), Européia (azul) e Ameríndia (verde). Cada coluna representa um indivíduo, que é agrupado em suas populações. Os três grupos do primeiro <i>bar-plot</i> representam as populações parentais (europeus, africanos e ameríndios), usadas para ajudar o <i>software</i> a estimar a ascendência dos indivíduos miscigenados; B) <i>Tri-plot</i> mostrando populações parentais agrupadas nos vértices e casos e controles espalhados no triângulo de acordo com suas ancestralidades. Cada círculo representa um indivíduo. Portadores de diabetes tipo 1 A estão em rosa, e controles em amarelo.....	45

Gomes KFB **A influência da estratificação populacional na susceptibilidade genética ao diabetes mellitus tipo 1 em uma população brasileira** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: A investigação de genes associados a doenças complexas em estudos caso-controle, baseada na frequência de variantes polimórficas, pode não ser adequada na presença de estratificação populacional advinda da mistura étnica, que é uma das características da população brasileira. Torna-se, portanto, difícil utilizar esta metodologia, pelo risco de associações espúrias devido às diferenças no *background* genético dos indivíduos casos e controles. Marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) podem ser aplicados para estimar ancestralidade e corrigir estas distorções. As mesmas variantes genéticas de susceptibilidade para o diabetes tipo 1 autoimune (DM1A) como os alelos HLA-DR3-DR4 e os polimorfismos do *PTPN22*, *CTLA4* e *VNTR-INS* presentes em caucasianos não foram sempre encontradas com a mesma frequência na nossa população com DM1A, ou conferiram risco menor quando presentes. Tais diferenças podem advir da nossa miscigenação. Portanto, no presente estudo, objetivou-se: 1) Analisar uma amostra de portadores de DM1A da cidade de São Paulo e controles não diabéticos, utilizando marcadores genéticos autossômicos de ancestralidade, identificando os componentes ancestrais individuais e os da população, permitindo assim, maior compreensão da sua potencial estratificação; 2) Verificar o papel dos alelos do sistema HLA-DR e DQ, dos polimorfismos dos genes *PTPN22*, *CTLA4* e *INS-VNTR*, na predisposição à doença, corrigindo para o viés introduzido pela estratificação da nossa população. **Materiais e métodos:** 915 pacientes com DM1A, idade de $24,6 \pm 13,0$ anos, 81,7% autorreferidos brancos e 789 controles, idade $28,5 \pm 11,5$ anos, 65,6% autorreferidos brancos participaram do estudo. A genotipagem dos 93 marcadores informativos de ancestralidade foi realizada por meio da plataforma BeadXpress (Illumina, EUA). A composição ancestral dos indivíduos foi caracterizada pelo programa *Structure* 2.3, e os alelos e variantes dos genes candidatos, testados por meio de análise *structured association*, utilizando o programa STRAT. **Resultados:** A ancestralidade européia prevaleceu no grupo de pacientes com DM1A e nos controles, (77% e 71%, respectivamente), seguida pela africana e ameríndia. Os alelos – DRB1*0301, –DR4 (subtipos -*0401, -*0402, -*0405) e – DR*09, e os alelos DQB1*0201 e -*0302 foram confirmados como predisponentes, mesmo após a correção para a estrutura de nossa população, assim como os alelos protetores – DRB1 (*0302, -*07, -*10, -*11, -*13, -*14 e -*15) e -DQB1 (*0402, -*0503, -*0602 e -*0603). Os haplótipos DRB1*0301/DQB1*0201, -*0401/0302, -*0402/0302, -*0405/0302, -*09/0202 predominaram no grupo DM1A, enquanto -*0302/0402, -*07/0202, -*10/0501, -*11/0301, -*11/0602, -*13/0603, -*14/0503 e -*15/0602 conferiram proteção. A correção para estratificação evidenciou o alelo DRB1*16 e o haplótipo -*07/0201 como de proteção e o DQB1*0501, que inicialmente era de proteção, como neutro. Também confirmou o haplótipo -*09/0202, como de risco e o -*0302/0402, de proteção, à semelhança do observado em afro-americanos. Os haplótipos -*10/0501, -*11/0602 e -*13/0603, protetores na nossa população e em afro-americanos, foram neutros nos caucasianos. A susceptibilidade determinada pelos genótipos I/I do *INS VNTR* e CT + TT do gene *PTPN22* foram

confirmadas após correção para estrutura populacional. O polimorfismo *CTLA4* rs231775A>G não pôde ser avaliado.

Conclusão: Evidenciamos diferenças nas variantes genéticas de susceptibilidade e proteção ao DM1A na nossa população em relação às caucasianas e afro-americanas, possivelmente decorrentes da mistura étnica. A correção para a estrutura populacional foi importante para confirmar a característica de proteção conferidas pelo alelo -DRB1*16 e haplótipo -*07/0201.

Descritores: diabetes mellitus tipo 1; predisposição genética para doença; grupos populacionais; genética populacional; genética; miscigenação.

Abstract

Gomes KFB The influence of population stratification in genetic susceptibility to type 1 diabetes in a Brazilian population [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Introduction: The investigation of genes associated with complex diseases in case-control studies, based on the frequency of polymorphic variants, may not be appropriate in the presence of population stratification arising from the ethnic admixture, which is characteristic of the Brazilian population. It is therefore difficult to apply this method, due to the risk of spurious associations related to differences in the genetic background of individual cases and controls. Ancestry informative markers (AIMs) can be used to estimate ancestry and correct these distortions. The same genetic variants of susceptibility to type 1 autoimmune diabetes (T1AD) like HLA- DR3 -DR4 alleles and polymorphisms in *PTPN22*, *CTLA4* and *VNTR-INS* genes usually present in caucasians were not always found at the same frequency in our population with T1AD, or conferred lower risk when present. These discrepancies may result from our miscigenation. Therefore, in this study, we aimed to: 1) analyze a sample of patients with T1AD and health controls, mostly living in São Paulo, using genetic autosomal markers of ancestry, to identify the ancestry of individual components and of the population, that could identify its potential stratification; 2) Evaluate the role of HLA-DR and -DQ alleles and polymorphisms of *PTPN22*, *CTLA4* and *INS-VNTR* genes in the predisposition to disease, correcting for the bias introduced by the stratification of our population. **Methods:** 915 patients with T1D, aged 24.6 ± 13.0 years, 81.7% self-reported as white and 789 controls, aged 28.5 ± 11.5 years, 65.6% self-reported as white participated of the study. Genotyping of 93 informative markers was performed by BeadXpress platform (Illumina, USA). The ancestry composition of individuals was characterized by Structure 2.3 program, and variants and alleles of candidate genes were tested using structured association analysis with the STRAT program. **Results:** The european ancestry prevailed in T1AD and control groups (77% and 71%, respectively), followed by african and amerindian. The -DRB1*0301, -DR4 (subtypes -*0401, -*0402, -*0405) and -DR*09 alleles as well as -DQB1 *0201 and -*0302 alleles were confirmed as predisposing to T1AD, even after correcting for the structure of our population. The same was observed for the protective alleles: -DRB1 (-*0302, -*07, -*10, -*11, -*13, -*14 and -*15) and -DQB1 (-*0402, -*0503, -*0602 and -*0603). HLA-DRB1*0301/DQB1*0201, -*0401/0302, -*0402/0302, -*0405/0302, -*09/0202 haplotypes predominated in T1AD group, while -*0302/0402, -*07/0202, -*10/0501, -*11/0301, -*11/0602, -*13/0603, -*14/0503 and -*15/0602 conferred protection. The correction for stratification evidenced DRB1*16 allele and -*07/0201 haplotype as protective and DQB1*0501, initially associated with protection, as neutral. This analysis also confirmed the -*09/0202, as a risk haplotype and -*0302/0402, -*10/0501, -*11/0602 and -*13/0603 as protective in our population, similar to reported in african-americans, although neutral in caucasians. The susceptibility to T1AD determined by *INS VNTR* I/I and *PTPN22* CT+TT haplotypes were confirmed after correcting for population structure. The *CTLA4* rs231775 A>G polymorphism could not be evaluated. **Conclusion:** We demonstrated differences in genetic variants associated with susceptibility and protection to T1AD in our population when compared to caucasian and african-american

populations, possibly due to the ethnic admixture. The correction for the population structure was important to confirm the protection conferred by -DRB1*16 allele and -*07/0201 haplotype.

Descriptors: type 1 diabetes mellitus; genetic predisposition to disease; population groups; genetics population; genetics; miscigenation.

1. Introdução

Em muitos países, a cor da pele tem sido, tradicionalmente, utilizada em estudos clínicos e farmacológicos como um fenótipo próximo à ancestralidade genômica (- conceito em que marcadores genéticos autossômicos são utilizados para avaliar o grau de mistura genética nas populações). O Brasil não é uma exceção. Porém, a população brasileira é formada por uma forte mistura de três diferentes raízes ancestrais: ameríndios, europeus e africanos. Em estudos prévios,^{1,2} com diferentes amostras, uma fraca correlação foi percebida entre cor e ancestralidade genômica nos brasileiros. Desta forma, se dispormos de um sistema de identificação racial baseado predominantemente em um único fenótipo, como acontece no Brasil, classificaremos um indivíduo apenas pela presença de certos alelos de um pequeno número de genes com impacto apenas na cor, ignorando o restante do genoma.

São inúmeras as publicações que citam que o diabetes mellitus tipo 1 A (DM1A) - doença que decorre da destruição autoimune das células (beta) β do pâncreas - é mais comum em *brancos*, porém sua incidência é variável entre as populações ditas *caucasianas* de diferentes países e também dentro de um mesmo país. Epidemiologicamente, a Finlândia e a Sardenha apresentam as maiores taxas de incidência mundial (superiores a 35/100.000/ano). As menores taxas são encontradas na maioria dos países da América do Sul e nos países asiáticos (inferiores a 5/100.000/ano), sendo, no Brasil, de 8/100.000/ano.^{3,4}

Em relação ao Brasil, estudos evidenciam que a frequência dos polimorfismos de risco para diabetes mellitus tipo 1 tem diferenças inter-regionais, bem como diferenças em relação às populações referidas como

caucasianas de outros países, reforçando a necessidade de ampliação de estudos de predisposição genética em nosso meio para definir melhor as variantes causais e as relacionadas à ancestralidade.³

A população brasileira é uma das mais heterogêneas no mundo, resultante da miscigenação de europeus, africanos e ameríndios, e estudos “transraciais” podem ser ferramentas poderosas na avaliação de associações genéticas em doenças multifatoriais como o diabetes.

1.1 Patogênese do DM1A

Diabetes autoimune ou diabetes mellitus tipo 1A é uma doença crônica resultante da destruição autoimune órgão específica, comprometendo as células β do pâncreas.³

O processo de destruição das células β culmina na liberação de antígenos que são captados e processados pelas células apresentadoras de antígenos (APC), que os apresenta aos linfócitos por meio das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC). As células T CD8 +, por sua vez, ativadas são responsáveis pela lesão direta das células β e liberação de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o interferon-gama (INF- γ). Este processo inicial é denominado insulite. Componentes da célula β , como a enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65 (GAD65) e a insulina, são fagocitados pelas células dentríticas e transportados para linfonodos regionais. Neste local, há o processamento e a

apresentação desses antígenos às células T CD4⁺ pelas moléculas MHC classe II, promovendo sua expansão clonal. Essas células se dirigem ao pâncreas recrutando células inflamatórias, agravando, ainda mais, o processo inicial de insulite.^{5,6}

O antígeno específico da célula β , alvo inicial do sistema imune, não está bem definido, mas os autoanticorpos contra vários componentes das células β , presentes no soro de pacientes recém-diagnosticados, são importantes marcadores da progressão do diabetes.⁷

As células B também agem como apresentadoras de antígeno, processo necessário para a expansão eficiente de células T CD4 autorreativas diabetogênicas. Assim, no DM1A, além da perda da tolerância pelas células T, há, também, perda da tolerância pelas células B, que expressam imunoglobulinas contra antígenos pancreáticos. A presença de autoanticorpos contra vários outros tecidos no DM1A pode ser resultado de alteração imunológica ampla.⁶

Os marcadores humorais mais frequentes de agressão imunológica são os anticorpos anti-insulina (IAA), anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático (ICA), anti-enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e antiproteína de membrana com homologia às tirosina-fosfatases ou antiantígeno 2 do insulinoma (anti-IA2). Tais autoanticorpos são raros na população-controle não diabética, com frequência de 2 a 5%.⁸

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

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

O anti-GAD65 pode estar presente em outras doenças autoimunes além do diabetes, e não necessariamente, implica em progressão rápida para a doença. Mantém sensibilidade de 70 a 80% para o diagnóstico de diabetes autoimune, independente da idade.

O anticorpo anti-IA2 é mais comum entre indivíduos jovens (até 15 anos de idade) e indica rápida progressão para o diabetes manifesto.⁹

Outro anticorpo recentemente estudado no DM1A é o Anti-ZnT8 (Anti-transportador 8 do Zinco). O zinco forma grânulos com a insulina, sendo importante para o seu estoque nas células β . Cerca de 60-80% dos pacientes com diagnóstico recente da doença apresentam títulos elevados desse anticorpo.⁵

O diagnóstico do DM1A baseia-se na presença de autoanticorpos contra antígenos das células β . Estes, em altos títulos ao diagnóstico, tendem a desaparecer com o tempo, à exceção do anti-GAD65.

1.2 Genética do DM1A

Durante a última década, com o aprimoramento dos estudos genéticos, muitos *loci* de susceptibilidade foram relacionados ao diabetes (*IDDM*), com

evidências de várias interações, sugerindo que o DM1A é uma doença poligênica com fatores contribuindo tanto para susceptibilidade quanto para proteção.⁶

Mais de 60 *loci* são conhecidos por estarem envolvidos na susceptibilidade ao DM1A:

Figura 1 - Odds ratio para uma série de “genes/*loci*” dos painéis de genoma recentes
Modificado de 6

IDDM1 - Complexo Principal de Histocompatibilidade-MHC

O principal *locus* envolvido na susceptibilidade ao diabetes está localizado no braço curto do cromossoma 6 e é responsável por 40 a 50% da herança genética de predisposição ao DM1A.

Figura 2 – Estrutura gênica do MHC humano, identificando os genes HLA de classe I (HLA-A, B e C), de classe II (HLA-DR, DQ e DP), e os de classe III
Modificado de 12

Como ilustrado na Figura 2, o sistema MHC que envolve o HLA (Antígeno Leucocitário Humano) é dividido em classes I, II e III, ou seja, genes agrupados em classe I (teloméricos) e classe II (centroméricos), separados pelos genes classe III. As moléculas de classe I e II estão envolvidas com a apresentação de peptídeos patogênicos aos linfócitos T e com a resposta imune adaptativa. Já a região classe III é responsável por proteínas importantes na resposta imune, como a proteína do choque térmico (HSP70), o complemento (C2 e C4) e o fator de necrose tumoral (TNF).⁶

As moléculas de classe I do sistema HLA, expressas na maioria das células somáticas, estão relacionadas ao processamento e à apresentação de antígenos intracelulares. São compostas por duas cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente, codificadas pelos genes A, B e C do cromossomo 6 (cadeia α) e o gene do cromossomo 15 (cadeia β 2-microglobulina).⁶

As moléculas de classe II do sistema HLA que são subdivididas em moléculas DQ, DR, DP, TAP, LMP e DM, segundo as diferentes sequências de

aminoácidos dessas cadeias¹¹, são expressas em um grupo de células do sistema imune, que incluem monócitos/macrófagos, células dendríticas, epiteliais tímicas, linfócitos B e linfócitos T ativados, e atuam no processamento e na apresentação de proteínas extracelulares. São compostas de duas cadeias polipeptídicas α e β associadas não covalentemente, ambas codificadas por genes do MHC. Os segmentos aminoterminais α 1 e β 1 interagem para formar a fenda de ligação peptídica. As proteínas extracelulares, capturadas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), são degradadas, e os peptídeos resultantes ligam-se às fendas de ligação peptídica das moléculas de classe II (Figura 3). Tais complexos serão reconhecidos como próprios ou não próprios pelos receptores dos linfócitos T (TCR), determinando a resposta imunológica a ser desenvolvida.⁶

Figura 3 - Interação do complexo da molécula HLA de classe II com peptídeo antigênico e o receptor da célula T
Modificado de 3

O sistema antígeno leucocitário humano (HLA) é o sistema mais polimórfico do genoma humano¹², contando com inúmeros alelos, que por sua vez, variam amplamente entre as populações, possivelmente relacionado ao grau de mistura destas populações.¹²

O mecanismo exato pelo qual o MHC atua na predisposição do DM1A não está completamente elucidado, mas, possivelmente, envolve o processo de deleção de clones de linfócitos autorreativos no timo. O polimorfismo das moléculas da classe II parece interferir na sua ligação com o peptídeo antigênico e o receptor do linfócito T, determinando deleções mais ou menos efetivas desses linfócitos, conferindo resistência ou susceptibilidade para a doença, respectivamente.¹²

Em relação à susceptibilidade ao diabetes tipo 1, os alelos –DR e DQ do sistema HLA-II proveem 40-50% de risco. A grande maioria dos pacientes caucasianos apresenta os alelos de classe II HLA-DR3 ou -DR4; e, aproximadamente, 10% a 15% destes são heterozigotos -DR3/DR4. Este genótipo confere o maior risco para DM1, seguido pelos genótipos -DR4 e DR3 em homozigose. O *locus* HLA-DQ é o mais associado à susceptibilidade. Este *locus* codifica múltiplas variantes da molécula HLA-DQ (heterodímero composto por 2 cadeias α e β) envolvidas no reconhecimento imune e apresentação do antígeno às células T helper CD4+. Os alelos DQA1*0301, DQB1*0302, DQA1*0501 e DQB1*0201 associam-se, fortemente, com DM1A.^{6,13,14}

IDDM2- *VNTR-INS*- variação no número de repetições de nucleotídeos 5' do gene da insulina.

A insulina é o único antígeno específico das células β pancreáticas. Células T CD8+ ativadas contra a molécula de insulina foram encontradas em pâncreas de portadores de diabetes. A região *VNTR* do gene da insulina (localizado no cromossomo 11p15) interfere com a expressão da insulina no timo e com a deleção de linfócitos T autorreativos. Há, aproximadamente, duas décadas descobriu-se que a variação no número de repetições de nucleotídeos 5' do gene da insulina (*VNTR*) associava-se com o desenvolvimento do DM1A. Pequeno número de repetições relaciona-se com aumento do risco (alelos classe I). É o segundo maior *locus* de susceptibilidade para desenvolvimento de DM tipo 1A (IDDM2), não relacionado ao MHC, conferindo risco de 10%.⁶

***PTPN22* – proteína tirosina fosfatase não receptor 22.**

O gene *PTPN22* está localizado no cromossoma 1p3 e codifica uma tirosina-fosfatase linfocitária que inibe a ativação das células T. Lymphoid-specific phosphatase (Lyp) exerce papel importante como regulador negativo da ativação das células T; a variante 1858 C/T interfere com esta regulação.¹⁵

CTLA4 - cytotoxic T lymphocyte antigen 4

Localizado no cromossoma 2q, é responsável por codificar uma molécula que regula negativamente a ativação da célula T, sendo seu polimorfismo rs231775 A/G também relacionado ao desenvolvimento de doenças autoimunes em geral.^{6,13,16}

1.3 Determinantes genéticos de DM1A na nossa população

Em estudos previamente realizados no Hospital das Clínicas e Laboratório de investigação Médica LIM-18 da FMUSP, foram avaliados 623 pacientes com diabetes tipo 1, com idade de $22,4 \pm 12,8$ anos e 793 indivíduos controles normais ($28,7 \pm 11,9$ anos), com relação aos seguintes genes de susceptibilidade ao DM1A:

- **SISTEMA HLA** - os alelos HLA-DR3 e/ou -DR4, estiveram presentes em 84,1% da nossa população diabética *versus* 95% de frequência reportada em outras populações caucasianas¹⁷;
- **Polimorfismo do gene *PTPN22* - 1858CT** - foi encontrado em 18,7% dos pacientes de nossa casuística *versus* 26,8 a 42,1% daqueles de populações caucasianas (EUA e Finlândia)¹⁸;
- **VNTR do gene da insulina** – a frequência do genótipo I/I (60,4%) foi inferior à de outras populações caucasianas com DM1A (75-85%)¹⁷;

- **Polimorfismo A>G posição +49 do *CTLA4*** - sua frequência foi menor na nossa população, 15% *versus* 26-68% de outras populações caucasianas; e na nossa casuística não conferiu risco para DM1A.¹⁷

Tais diferenças podem advir da grande heterogeneidade da nossa população.

1.4 Raça e etnia

Raça é um conceito difícil de ser definido rigorosamente. A definição clássica é que raças diferem nas frequências de, pelo menos, alguns genes.¹⁹ No entanto, características morfológicas, como cor da pele, textura do cabelo, formato e tamanho da cabeça não definem rigorosamente raça¹⁹, porque, provavelmente, resultam da adaptação às condições ambientais ou podem ter sofrido evolução convergente²⁰ e, principalmente, não descrevem a maioria dos indivíduos com a complexidade requerida para entender e reconhecer nossa diversidade genética.²¹ Embutem, muitas vezes, fatores genéticos e ambientais dentro de um mesmo classificador.

No século XX, houve uma tentativa de troca do termo *raça* por *etnia*, para melhor classificar as populações humanas. Etnias são grupamentos populacionais que refletem aspectos culturais, socioeconômicos e religiosos em oposição às características físicas e suposta ancestralidade. No entanto, os problemas foram mascarados, mas não corrigidos: há fluidez na definição de etnias, dependendo de circunstâncias, e as etnias são igualmente falhas na

classificação de similaridade genética.²² Além disso, há substancial sobreposição dos termos *raça* e *etnia*.²²

Outro elemento central na maioria das discussões sobre raça e etnia é a pigmentação da pele, mas as pesquisas baseadas na genética da variação populacional desse fenótipo são escassas.²³ A pigmentação da pele é um dos fenótipos mais variados em humanos, mas muito pouco se conhece sobre a base genética e história evolutiva desta característica poligênica. Diferenças na cor da pele entre as populações são comumente (e incorretamente) entendidas como uma indicação de grandes diferenças biológicas entre elas.

1.5 Estudos de Associação e as dificuldades geradas pela estratificação populacional

A abordagem geralmente mais utilizada para doenças complexas é o estudo de caso-controle, no qual se procura verificar se a frequência de variantes polimórficas difere entre o grupo de pacientes e controles. Muitos estudos de caso-controle têm sido realizados para encontrar fatores de suscetibilidade a doenças complexas, seja investigando um gene candidato, ou região candidata, ou o genoma inteiro através de densos painéis de marcadores genéticos (GWAS).

O maior problema dessa abordagem, entretanto, é a estratificação populacional decorrente da mistura étnica, ou seja, a presença de subgrupos relativamente distintos dentro da população aparentemente homogênea sob estudo. Subgrupos ancestralmente distintos tendem a ter representações

majoritárias de diferentes ancestralidades no nível genético e, assim, uma associação de um alelo super-representado nos pacientes em relação aos controles pode ser decorrente da maior frequência desse alelo na população ancestral predominante nos casos.

Uma maneira de corrigir o efeito da estratificação é a inclusão dos pais de afetados como um controle interno, no intuito de detectar desequilíbrio na transmissão dos alelos (aplica-se nessa abordagem o teste TDT, do inglês, *transmission disequilibrium test*). Contudo, na prática, é bastante difícil conseguir amostra dos pais dos pacientes.

Por isso, mais recentemente, muitos estudos têm se dedicado à caracterização de populações através do uso de marcadores informativos de ancestralidade (AIMs), ou seja, polimorfismos de frequências alélicas que são substancialmente diferentes entre as populações.

1.6 Marcadores população-específicos

A partir da genotipagem de milhares de polimorfismos em populações diversas, pode-se escolher uma pequena amostra de marcadores autossômicos que apresentam discordância extrema entre as populações. Estes marcadores são denominados *Ancestry Informative Markers*, ou marcadores informativos de ancestralidade (AIMs).

A introdução dos AIMS permitiu a melhor estimativa de ancestralidade biogeográfica, em nível populacional, de subgrupos (casos e controles) e individual.^{19,24} Um parâmetro muito utilizado neste tipo de estudo é a diferença de frequência alélica, definida como o valor absoluto da diferença das frequências entre populações ancestrais.²³⁻²⁷ Por proverem alta informação sobre ancestralidade, esses marcadores aumentam o poder para detectar associações espúrias entre casos e controles e os efeitos genéticos com maior poder e precisão.

Além de servir como um controle para a estratificação da população, a estimativa de ascendência genética tornou-se particularmente importante em estudos de populações recentemente misturadas, como os afro-americanos e latinos.²⁵

Diversos grupos geraram e validaram os seus AIMS para diferenciar as populações mundiais.²⁹⁻³³ Quanto mais distantes geneticamente, menor o número de marcadores necessários para diferenciar duas populações. Para as populações continentais, bastam 24 SNPs para avaliações com grandes intervalos de confiança, porém a acurácia melhora significativamente com 64 SNPs ou mais.²⁹ Já para diferenciar populações de países europeus, por exemplo, são necessários números maiores de SNPs (300-1000).³³

Tem-se buscado estimar os marcadores necessários para caracterizar satisfatoriamente uma população quanto à sua ancestralidade (Tabela 1). Barbujani *et al.* (1997)³⁴ verificaram 109 marcadores (30 microssatélites e 79 sítios de restrição polimórficos) em indivíduos de 16 populações. Romualdi *et al.* (2002)³⁵ analisaram 21 inserções Alu em 32 populações. Rosenberg *et al.* (2002)³⁶ e Excoffier *et al.* (2003)³⁷ agruparam 52 populações em 5 grandes

grupos geográficos utilizando-se de 377 microssatélites autossômicos obtendo resultados ligeiramente diferentes. Já Bastos-Rodrigues *et al.* (2006),³⁸ utilizando apenas 40 marcadores indels dialéticos, caracterizaram de forma satisfatória a estrutura do genoma das mesmas populações estudadas por Rosemberg (2002) e Excoffier (2003).

Embora os estudos tenham obtido resultados semelhantes no agrupamento de populações em regiões maiores, houve algumas discrepâncias na estimativa da variabilidade genética entre indivíduos dentro de uma mesma população, entre populações dentro de uma região e entre regiões, como visto na tabela seguinte (Tabela 1).

Tabela 1 - Estudos de caracterização de populações baseados em marcadores de ancestralidade

Autor e ano de estudo	Marcadores	Nº de loci	Nº de populações	Nº de regiões	Variabilidade entre indivíduos dentro da população (%)	Variabilidade entre populações dentro da região (%)	Variabilidade entre regiões (%)
Barbujani et al, 1997	RFLPs	79	11	5	84,5	3,9	11,7
Barbujani et al, 1997	Microssatélites	30	14	5	84,5	5,5	10,0
Romualdi et al, 2002	Inserções Alu	21	32	5	82,9	8,2	8,9
Rosemberg et al, 2002	Microssatélites	377	52	5	93,2	2,5	4,3
Excoffier et al, 2003	Microssatélites	377	52	5	87,6	3,1	9,2
Bastos-Rodrigues et al, 2006	Indels	40	52	5	85,7	2,3	12,1

Modificado de 30

Com o sequenciamento do genoma humano e os recentes avanços na identificação e genotipagem de variantes genéticas em centenas de *loci* e em centenas de indivíduos, ampliou-se, ainda mais, o entendimento do padrão global de variação genética.

Durante e após o Projeto Genoma Humano,^{39,40} houve uma explosão de estudos das variantes genéticas nas diversas populações.⁴¹⁻⁴³ O *HapMap Project* (Mapa de Haplótipos) pode ser considerado uma segunda fase do projeto Genoma⁴⁴ e o *1000 Genomes Project*, uma terceira^{45,46} – ambos avaliando a variabilidade individual e populacional.

1.7 Métodos empregados em estudos de genética de populações

Existem inúmeros algoritmos e programas computacionais para a separação genética dos grupos e estudo de genética populacional.⁴⁷ Atualmente, os mais utilizados são *Eigenstrat*⁴⁸ (baseado em análise de componentes principais) e *Structure*⁴⁹ (que utiliza métodos bayesianos). De maneira geral, análise de componentes principais tem um desempenho melhor no estudo de muitos (>1000) marcadores, porém resultados insatisfatórios com pequenas quantidades (<50). É também interessante por não necessitar da determinação do número de grupos pré-teste. Em contrapartida, programas como *Structure* apresentam resultados robustos com poucos marcadores (<50), mas tornam-se inviáveis do ponto de vista computacional quando avaliamos muitos indivíduos e marcadores (>1000). Há, ainda, outros métodos

que possibilitam a análise de ancestralidade para cada segmento cromossômico individualmente.⁵⁰⁻⁵²

2. Justificativa

Doenças como diabetes tipo 1 e tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemia e a maioria das doenças neurológicas, são consideradas doenças complexas, as quais sofrem influência de múltiplos fatores ambientais em combinação com diversas variantes genéticas herdadas de forma não mendeliana. Estas variantes genéticas associadas aos fenótipos complexos (não só doenças) podem ser de qualquer natureza – polimorfismos de base única (SNPs), variantes do número de cópias (CNVs), inserções, deleções e translocações.⁵³

Em um estudo publicado por Schlesinger D e colegas, reforçou-se a importância dos AIMS. Epidemiologicamente, nos Estados Unidos, os dados mostram que a doença de Alzheimer é mais prevalente em descendentes de africanos quando comparados aos caucasianos. Porém, os resultados deste estudo sugerem o contrário: que indivíduos brasileiros com ancestralidade africana (≈55%) apresentam menor prevalência de placas neuríticas (achado que define patologicamente o Alzheimer) na análise univariada, e quando ajustado para idade, sexo, genótipo de APOE (gene da apolipoproteína E) e fatores de risco ambientais.⁵⁴

A identificação de genes de predisposição ao DM1A é importante no entendimento da sua etiologia, definição da população de risco, e, por conseguinte, na sua prevenção, sendo que há poucos estudos avaliando os marcadores genéticos nos portadores de DM1A no Brasil e, em nenhum desses, houve caracterização genética da ancestralidade.

Em estudos prévios, foram verificadas diferenças na frequência dos alelos HLA-DR e DQ em relação a outras regiões do Brasil e em relação às

populações caucasianas, bem como na prevalência dos polimorfismos do *PTPN22*, *CTLA4* e *VNTR-INS*, que também foi menor nos nossos pacientes quando comparada à dos caucasianos (de outras populações).^{17,18}

Há poucos estudos avaliando marcadores genéticos nos portadores de DM1A no Brasil e, em nenhum desses, houve caracterização genética de ancestralidade.

No presente estudo, deu-se continuidade à avaliação genética dos pacientes com diabetes tipo 1 e seus controles, incluindo determinantes de causalidade, bem como, determinantes genéticos de ancestralidade. Classificamos a nossa população quanto a estratificação e utilizamos uma abordagem para afastar o viés que esta estratificação possa exercer no “impacto” de causalidade dos alelos e polimorfismos de susceptibilidade ao diabetes mellitus tipo 1 A. Esta estratégia é única em nosso meio e certamente ajudará na melhor caracterização de portadores de diabetes na nossa população e na definição dos indivíduos de risco para o desenvolvimento da doença.

3. Objetivos

- Analisar uma amostra de indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 1A e controles não diabéticos atendidos na cidade de São Paulo, utilizando marcadores genéticos de ancestralidade autossômicos, identificando os componentes ancestrais desta população, permitindo maior compreensão da sua potencial estratificação;
- Verificar o papel dos alelos do sistema HLA-DR e DQ, dos polimorfismos dos genes *PTPN22*, *CTLA4* e da variação do número de repetições de nucleotídeos 5' do gene da insulina (*VNTR*), na predisposição à doença, corrigindo para o viés introduzido pela estratificação da nossa população, ou seja, controlando para mistura desta;

4. Material e Métodos

4.1 Considerações Éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com os 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 pesquisa fossem iniciados. Este projeto foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e aprovado como Protocolo de Pesquisa nº 14212-7.

4.2 Casuística

4.2.1 Pacientes

Este grupo foi composto por 915 pacientes com DM1A com idade de $24,6 \pm 13,0$ anos, atendidos no Hospital das Clínicas da FMUSP, recrutados no ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da FMUSP ou encaminhados por médicos interessados na pesquisa, em sua maioria, residentes em São Paulo.

- **Critérios de inclusão**

Diagnóstico laboratorial de diabetes: duas glicemias de jejum maior ou igual a 126mg/dl e/ou HbA1C $\geq$ 6,5% em duas ocasiões; e/ou uma glicemia aleatória de 200mg/dl com sintomas clínicos de diabetes (perda de peso, poliúria, polidipsia);⁸⁵

Hiperglicemia grave ou cetoacidose no momento do diagnóstico com necessidade precoce de insulinoterapia contínua;

Evidência laboratorial de diabetes autoimune: presença de um ou mais autoanticorpos pancreáticos positivos.

- **Critérios de exclusão**

Diabetes de causa não autoimune;

4.2.2 Controles

O grupo-controle compreendeu 789 indivíduos voluntários saudáveis com idade de $28,5 \pm 11,5$ anos, também residentes em São Paulo, não familiares dos pacientes do grupo de diabéticos, sem história familiar de diabetes ou qualquer outra doença autoimune, com glicemia e hemoglobina glicada normais.

4.3 Estudo Molecular

DNA genômico foi obtido a partir de 15 mL de sangue periférico, colhido com 25mM do etileno diaminotetracético (EDTA). Após extração pelo método de “*salting-out*”,⁵⁶ o DNA genômico foi quantificado em espectrofotômetro *Ultrospec III* (Amersham Pharmacia Biotech) e as amostras diluídas para a concentração final de 100ng/ μ L, para os ensaios de genotipagem. Estas amostras de DNA genômico fazem parte do Banco de DNA do Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios – LIM 18 e Laboratório de Genética Molecular – LIM 25.

Para esse projeto, ampliamos as análises dos genes de susceptibilidade ao DM1A (alelos, genótipos e haplótipos do sistema HLA DR/DQ e variantes dos genes *CTLA4*, *PTPN22* e *VNTR-INS*) que já haviam sido feitas em estudos prévios do nosso laboratório, de ambos os grupos (casos e controles), cuja metodologia foram as apresentadas a seguir.

4.3.1 Genotipagem do sistema HLA DR-DQ (genérico e subtipagem)

Foi realizado a tipagem de DNA para alelos HLA de classe II genéricos e específicos pelo sistema de tipagem de DNA LabType SSO (One Lambda INC, California, USA). Este fornece sondas de oligonucleotídeos de sequência específica (SSO), imobilizadas em microesferas para identificação de alelos

HLA em amostras de DNA genômico, amplificadas por meio de PCR e posterior hibridação.

O DNA-alvo é amplificado usando um *primer* grupo-específico. O produto da PCR é biotinilado (marcado com biotina), o que permite sua detecção usando estreptavidina conjugada com R-ficoeritrina.

O produto da PCR é desnaturado, permitindo nova hibridação com sondas complementares ao DNA-alvo, as quais se ligam a microesferas codificadas fluorescentemente. Um analisador de fluxo – analisador Luminex – identifica a intensidade de fluorescência de ficoeritrina em cada microesfera. O *software* de análise, que é fornecido com o kit, auxilia na determinação de genotipagem da amostra de DNA.⁵⁷

4.3.2 Genotipagem dos alelos de classe I e III do *locus VNTR* do gene da insulina

A região que contém o polimorfismo na posição -23 do códon de iniciação do gene da insulina foi amplificada com a utilização dos iniciadores: -23F: 5' agcaggtctgtccaagg 3' e -23R: 5' cttgggtgtgtagaagaagc 3'. O polimorfismo foi analisado por ensaio de restrição com a enzima Hph I.⁵⁸

4.3.3 Genotipagem do *CTLA-4*. Polimorfismo +49A/G:

O polimorfismo do alelo A/G do gene do *CTLA-4* (rs231775 A/G) no exon 1 na posição 49, que codifica a substituição no códon 17 da treonina (GCC) por alanina (ACC), foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico, seguido pela digestão com enzima de restrição Bbv I. Os iniciadores utilizados foram 49F: 5' gctctattcatgaagacct 3' e 49R: 5' -agtctcactcacctttgcag-3'.⁵⁹

4.3.4 Genotipagem dos AIMs (*Ancestrive Informative Markers*)

Para a inferência de composição ancestral, foram utilizados 93 SNPs relacionados a seguir (Suplemento 1), descritos como marcadores de ancestralidade autossômicos por Nassir e colaboradores.²⁹

Os genótipos destes SNPs foram obtidos de 210 pessoas de 4 populações estudadas na primeira fase do HapMap: YRI (Nigéria), CEU (CEPH europeus), CHB (China) e JPT (Japão).⁶⁰ Estes foram combinados com os das amostras de 1.043 pessoas de 51 populações estudadas no *Human Genome Diversity Panel* (HGDP).⁶¹ Todas as amostras estão disponíveis livremente nos sítios dos projetos na Internet.^{29,39}

Apesar de muitos estudos anteriores identificarem AIMs, que distinguem combinações particulares de grupos continentais, o conjunto AIMs atual tem

várias características importantes. Estas incluem: 1) a validação usando muitos grupos populacionais diferentes de todos os continentes; e 2) os resultados das genotipagens são amplamente disponíveis e podem ser facilmente incorporadas nas análises.²⁹

Esses SNPs são capazes de fornecer informações sobre mistura para populações miscigenadas tais como africanos subsaarianos, europeus e ameríndios, e realizar os testes de associação estruturada no contexto de grupos de populações mistas ou miscigenadas.^{29,62}

A genotipagem dos SNPs informativos de ancestralidade foi realizada por meio da plataforma BeadXpress (Illumina, EUA), que permite a genotipagem de inúmeros SNPs em reações multiplex; em colaboração com o grupo da Profa. Maria Rita Passos-Bueno (do Instituto de Biosciências da Universidade de São Paulo - IB-USP).

Do total da casuística de 1.704, foram selecionadas 1.284 amostras para este ensaio (632 pacientes com diabetes/652 controles), com base na qualidade destas e em outros critérios descritos adiante; e analisadas por meio do ensaio de genotipagem Goldengate (Veracode, Illumina, EUA)⁶³ em placas de 96 *wells*, cuja metodologia incluiu: **ativação e precipitação do DNA** de cada amostra por meio de reagentes; **ressuspensão, biotinilação e combinação do DNA** com os oligonucleotídeos, reagentes de hibridização e partículas paramagnéticas; **incubação**, para que os oligonucleotídeos de cada sequência de interesse se anelassem com as amostras de DNA biotiniladas e o DNA fosse capturado por partículas paramagnéticas; **adição de *master mix*** para que ocorresse a reação de extensão e ligação dos oligonucleotídeos hibridizados no DNA; **adição da *Taq-DNA polimerase Titanium*** aos *primers*,

para o processo de **PCR**. Para a reação de PCR foram utilizados 3 *primers* universais: dois foram corantes fluorescentes e o terceiro biotinilado, e por fim, a ciclagem termal da placa de PCR para a **fluorescência e amplificação dos templates** gerados no processo pré-PCR. A **leitura no aparelho BeadXpress**, onde o laser foi utilizado para agitar os fluoróforos Cy3 e Cy5 dos produtos de PCR ligados às *beads* e emissões fluorescentes foram reportadas em um banco de dados e lidas pelo **software Genome Studio**.⁶³

Todo este processo para realização de uma placa leva em torno de 40 horas.

4.3.5 Controle de qualidade das amostras e dos SNPs genotipados

Para reduzir a ocorrência de associações falsas, foi necessário a realização do controle de qualidade das amostras e dos SNPs analisados. Dentre os critérios utilizados no controle de qualidade das amostras, avaliou-se a eficiência de genotipagem (*call rate*), que é o parâmetro máximo para qualidade da amostra, sendo que no presente estudo foi utilizado *call rate* > 95%, seguindo recomendações do ensaio utilizado. Outros critérios com relação as amostras, como duplicidade e informações sobre o gênero das amostras também foram consideradas. Com relação aos SNPs, o controle de qualidade levou em consideração a eficiência da genotipagem, que é o parâmetro chamado SNP *gene train score* (desempenho do SNP), que nesse estudo foi considerado maior ou igual a 0,65, sendo que a grande maioria dos SNPs obtiveram *gene train*

score maior ou igual a 0,90.⁶³ De um painel de 93 SNPs informativos de ancestralidade (suplemento 1)²⁹, os seguintes foram excluídos de nossa análise: rs11652805, rs4717865, rs6548616, e rs1950993, por terem apresentado baixo desempenho de genotipagem, resultando em 89 SNPs incluídos no estudo.

O desvio com relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg ($<0,05$) também foi considerado como controle de qualidade dos SNPs, e nenhum destes estava fora de equilíbrio.

4.4 Avaliação bioquímica

Glicemia

As amostras de sangue para a dosagem da glicose foram colhidas com o anticoagulante, fluoreto de sódio-EDTA. O método utilizado foi o enzimático-colorimétrico, específico para glicose: sistema (glicose oxidase-peroxidase), kit comercial LABTEST GOD-ANA (Brasil). Os valores de glicose foram considerados normais entre 70 e 99mg/dl, no plasma em jejum.⁶⁴

Hemoglobina Glicada

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

Peptídeo-C

As determinações de peptídeo-C foram obtidas por técnicas de radioimunoensaio, utilizando reagentes HCP-20K da *Millipore Corporation* (Billerica, MA, USA), em amostras de soro colhidas em jejum. Os valores considerados normais foram de 0,5 a 1,5 ng/mL. As variações intra e entre ensaios em torno de 4,5%. O menor nível detectável de peptídeo-C, pela técnica, foi de 0,1ng/mL.

Autoanticorpos pancreáticos

As dosagens dos anticorpos anti-GAD65 e anti-IA2 foram realizadas por radioimunoensaio (RSR, UK), em que o antígeno recombinante (GAD65 ou IA2), marcado com 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. O imunocomplexo marcado agregado foi separado por centrifugação e a quantificação de I^{125} , presente no precipitado, contendo o

imunocomplexo, foi efetuada em contador gama automático (Cobra II, Perkin-Elmer). A quantificação dos anticorpos foi realizada por extrapolação, a partir da curva padrão realizada no mesmo ensaio. Foram efetuadas curvas padrão com anti-GAD65, com concentrações entre 0,1 U/ml a 300U/ml, e com anti-IA2, entre 0,1 a 50U/ml. O nível médio de anti-GAD65 analisado em nosso laboratório em 787 indivíduos-controle foi $0,11 \pm 0,46$ U/ml e os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 3 e 5,5%, respectivamente.

Foram consideradas negativas as amostras com anti-GAD65 ≤ 1 U/ml (98,9% dos controles); já os valores $> 1,0$ U/ml foram considerados positivos.

Em relação ao anti-IA2, os valores médios da população-controle foram $0,1 \pm 0,23$ U/ml. As amostras consideradas negativas variavam entre 0 a 0,8U/ml (98,9%) e as variações intra e interensaio foram 4,3% e 3,4%, respectivamente. Os valores $> 0,8$ U/ml foram considerados positivos.

A presença desses autoanticorpos está representada em U/mL, uma unidade arbitrária do fabricante indicada no anticorpo-calibrador. Nestes mesmos reagentes, testou-se um “padrão biológico da NIBSC 97/550” para autoanticorpos Anti-GAD e Anti-IA2, que proporcionou a seguinte equivalência de valores para cada um dos anticorpos-calibradores: 25U/mL e 125 U/mL do NIBSC 97/550 para 1U/mL de anti-GAD e de anti-IA2, respectivamente, da RSR Ltda.

O anticorpo anti-ZnT8 foi dosado por meio da técnica de Elisa – utilizando os reagentes da Zinc Transporter 8 (ZnT8) Autoantibody ELISA (kit catalog number KR7730-96 Well) fornecidos pela Kronus, USA.

As amostras de soro ou padrão de anticorpos anti-ZnT8 são incubadas a 4°C , durante 16 às 20hs, em microplacas tratadas com antígeno ZnT8. O

sistema de detecção é tipo sanduíche, com os anticorpos da amostra que, se presentes, se ligam aos antígenos presentes na superfície de cada poço da placa. Após o tempo necessário para a captura dos anticorpos, realizam-se lavagens para retirada de produtos não ligados na superfície. Após a adição do antígeno ZnT8 marcado com Biotina, a presença de anticorpos anti-ZnT8 é revelada, indiretamente, numa reação enzimática Estreptavidina-Peroxidase na presença de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina) adicionado nos poços. A leitura do produto colorido é proporcional à presença do anticorpo presente na amostra que ficou ligado, especificamente, ao ZnT8 da placa, na primeira incubação (16-20hs). A quantificação das amostras é feita diretamente da leitura a 450 nm em fotômetro, da curva-padrão (concentração de 10, 20, 75, 500 e 2.000 U/mL) corrida na mesma placa. O valor de corte recomendado pelo fabricante (*cut off*) deste ensaio é de <15U/mL para valores negativos e a unidade representada é uma unidade arbitrária do fabricante.

5. Análise estatística

Na análise descritiva, as variáveis quantitativas foram apresentadas por média e desvio-padrão (DP), e os dados categóricos, por frequência absoluta e relativa.

Utilizou-se o teste do Qui quadrado ou teste exato de Fisher, para a comparação das variáveis qualitativas entre os grupos. O valor de *Odds Ratio* (OR) foi calculado para avaliar o impacto das características qualitativas, utilizando a correção de Woolf, quando necessário.

A distribuição das variáveis foi feita através do Teste de Kolmogorov-Smirnov.

Comparação entre as variáveis numéricas com distribuição paramétrica foi realizada por meio do teste *t de Student*, e de Mann Whitney para as não paramétricas.⁶⁵⁻⁶⁸

Para verificar se a variabilidade das médias em dois grupos era ou não igual, quando necessário, foi feito *teste de Levene*.

No estudo dos genótipos, o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado por meio do teste do Qui-quadrado.

Nas análises, consideramos o nível de significância de 0,05, que equivale a 95% de confiança.

5.1 Inferência da composição ancestral

Para inferir a composição ancestral dos indivíduos da nossa casuística, usamos o programa *Structure* 2.3.^{49,69,70} Resumidamente, este assume a existência de K populações parentais da população miscigenada que está

sendo testada (em que K será definido por nós como igual a 3, baseado na conhecida composição européia, africana e ameríndia da nossa população) e agrupa, por meio de inferência bayesiana, os indivíduos miscigenados por proximidade a cada uma das populações parentais. Assim, obteremos para cada indivíduo sua fração de contribuição genômica européia, africana e ameríndia.

Mais especificamente, este programa modela os indivíduos amostrados como tendo herdado seus genes de um grupo de K subpopulações "não estruturadas" (em que K pode ser desconhecido). É assumido que, dentro das populações, os *loci* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (tendo sido testados para tal), e sem desequilíbrio de ligação. As frequências alélicas em cada *locus* dentro de cada subpopulação são consideradas não conhecidas. O *background* genético de cada indivíduo é representado por um vetor $q = (q_1, \dots, q_K)$, em que q_k é a proporção do genoma do indivíduo que se originou na subpopulação k . Isso fornece uma maneira flexível para capturar vários padrões de mistura.⁴⁹

Este teste é baseado na idéia de que qualquer associação entre um alelo candidato e o fenótipo dentro de uma subpopulação não pode ser devido à estrutura da população; e utiliza a cadeia de Markov/método de Monte Carlo para estimar o número de subpopulações, as frequências alélicas em cada subpopulação, e o valor de " q " (vetor de ancestralidade) para cada indivíduo amostrado.⁴⁹

Enfim, este método calcula a proporção do genoma de um indivíduo originário a partir de cada população inferida (método de agrupamento quantitativo – *clusters*). Para tentar definir os grupos (*clusters*) a que cada

indivíduo “tende a se deslocar”, verifica-se a frequência alélica de cada um dos 89 SNPs e determinam-se grupos por meio de cálculo de frequência ponderada, para se chegar ao “peso” que cada SNP tem em relação ao K populações parentais (africano, ameríndio e europeu).

O método pode ser aplicado à maioria dos marcadores genéticos normalmente utilizados, incluindo microssatélites e SNPs. A precisão da inferência depende do tamanho da amostra, do número de *loci* utilizado e da magnitude das diferenças de frequências de alelos entre as subpopulações.⁴⁹

5.2 Teste de associação

Após a estimativa de contribuição de ascendência, os SNPs contidos nos genes candidatos foram testados por meio de uma análise chamada *structured association*, utilizando o programa STRAT (:Teste de Associação População Estruturada).

Este programa consiste em um método estatístico para a realização de mapeamento de associação em populações estruturadas, assumindo que não há estratificação e condicionado para linhagens individuais. Essa abordagem oferece algumas vantagens sobre métodos de associação baseados em família, como a TDT (*Transmission Disequilibrium Test*), que também são válidos na presença de estrutura da população; sendo a mais importante, o fato de que a coleta de amostras de DNA de casos não relacionados e controles, é, na maioria das vezes, mais fácil do que coletar dos familiares de indivíduos afetados; além disso, a capacidade de usar controles independentes

sugere a possibilidade de estabelecer bases de dados de genótipos que podem ser compartilhados entre os diversos estudos. Ainda, a TDT geralmente requer 50% de genotipagem extra em cada *locus* candidato, enquanto STRAT requer uma série de marcadores não ligados para inferir a estrutura da população.

Em síntese, essa abordagem consiste em um estudo de caso-controle com correção para os vieses que a estratificação populacional introduz nos estudos de associação.¹⁸

6. Resultados

6.1 Estratégias do estudo

Participaram desse estudo 915 pacientes com diabetes tipo 1, com idade de $24,6 \pm 13,0$ anos e 789 indivíduos controles ($28,5 \pm 11,5$ anos), para os quais foram determinados: níveis séricos de glicose, HbA1c, peptídeo C, autoanticorpos pancreáticos, genes do sistema HLA (alelos DR e DQ), e polimorfismos do *PTPN22*, *CTLA4* e *INS-VNTR*.

6.2 Características da população

As características dos grupos estão apresentadas na Tabela 2. Os portadores de DM1A compreendiam o grupo mais jovem, quando comparado aos controles ($p < 0,0001$), com predomínio do sexo feminino ($p < 0,0001$) e menor IMC (índice de massa corporal, $p < 0,0001$). Em relação à cor autorreferida, a cor branca foi a mais prevalente nos dois grupos; entretanto, no grupo diabetes, houve maior frequência de autoreferidos brancos ($81,7\% \times 65,6\% - p < 0,0001$), e menor frequência de pardos ($15,4\% \times 27,8\% - p < 0,0001$) e de negros ($2,4\% \times 5,9\% - p = 0,0003$), em relação aos controles.

Tabela 2 - Dados demográficos dos pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles normais

Variável	DM1 A n (%) 915	Média $\pm$ DP	Controles n (%) 789	Média $\pm$ DP	P
Idade (anos)	—	24,6 $\pm$ 13,0	—	28,5 $\pm$ 11,5	<0,0001
Duração da doença (anos)	—	12,4 $\pm$ 10,6	—	—	—
Idade de diagnóstico (anos)	—	12,3 $\pm$ 8,4	—	—	—
Sexo					
Masculino	388 (42,4%)		477 (60,5%)		<0,0001
Feminino	527 (57,6%)		312 (39,5%)		
IMC (kg/m ²)	21,8 $\pm$ 4,3		24,2 $\pm$ 3,5		<0,0001
Cor auto-referida					
Branco	729 (81,7%)		490 (65,6%)		< 0,0001
Pardo	137 (15,4%)		208 (27,8%)		<0,0001
Negro	21 (2,4%)		44 (5,9%)		0,0003
Amarelo	5 (0,6%)		5 (0,7%)		0,7782

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos; DP= desvio-padrão, IMC= índice de massa corpórea.

Na população com diabetes, a idade de diagnóstico foi 12,3 $\pm$ 8,4 anos e a duração da doença de 12,4 $\pm$ 10,6 anos. Glicemia de jejum e HbA1c foram maiores ($p < 0,0001$), e as concentrações de peptídeo C foram menores ($p < 0,0001$), quando comparadas às do grupo-controle (tabela 3).

Os títulos dos autoanticorpos pancreáticos foram maiores e mais frequentes nos pacientes ($p < 0,0001$). O anti-GAD estava presente em 47,3% dos pacientes *versus* 1,5% dos controles ($p < 0,0001$), o anti-IA2, em 42,5% *versus* 1,9% dos controles ($p < 0,0001$) e o anti-ZnT8 em 48,9% *versus* 1,9% de indivíduos controles ($p < 0,0001$) (tabela 4).

Tabela 3 - Características laboratoriais de pacientes portadores de diabetes tipo1A e controles normais

Variável	DM1A Média±DP	Controles Média±DP	P
Glicemia (mg/dL)	189,3 ± 113,7	83,5 ± 9,8	<0,0001
HbA1c %	8,4 ± 2,2	5,1 ± 0,4	<0,0001
Anti-GAD65 (U/mL)	10,8±25,4	0,12±0,68	<0,0001
Anti-IA2 (U/mL)	3,5±9,0	0,10± 0,23	<0,0001
Anti-ZnT8 (U/mL)	201,8 ± 382,6	3,3 ± 11,3	<0,0001
Peptídeo C (ng/dL)	0,37 ± 0,31	2,21±1,73	<0,0001

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, DP= desvio-padrão, GAD65= descarboxilase do ácido glutâmico 65, IA2= proteína de membrana com homologia às tirosina-fosfatases, ZnT8=transportador de zinco 8.

Tabela 4- Distribuição dos autoanticorpos pancreáticos em pacientes portadores de diabetes tipo1A e controles normais

Autoanticorpos	DM1A n (%)	Controles n (%)	OR	IC	P
Anti-GAD65	349 (47,3)	12 (1,5)	57,8	32,1 a 104,0	<0,0001
Anti-IA2	294 (42,5)	15 (1,9)	37,9	22,3 a 64,6	<0,0001
Anti-ZnT8	200 (48,9)	6 (1,9)	49,9	21,7 a 114,6	<0,0001

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança, GAD65= descarboxilase do ácido glutâmico 65, IA2= proteína de membrana com homologia às tirosina-fosfatases, ZnT8=transportador de zinco 8.

6.3 Composição ancestral

Obtivemos a contribuição percentual de cada uma das três populações ancestrais (européia, africana e ameríndia), tanto para o grupo de pacientes portadores de diabetes tipo 1 A, quanto para o grupo controle; resultando em uma contribuição média de ascendência 15% africana, 77% européia e 7,3% ameríndia para pacientes e 21% africana, 71 % européia e 7,9% ameríndia

para os controles. A tabela 5 resume as contribuições de ascendência estimadas para os grupos DM1 A e controles. Contribuições de ascendência individuais são representadas graficamente na Fig. 4. Apresentamos também os gráficos *Tri-plot* e *Bar-plot* relacionados a essas estimativas individuais, onde as cores representam:

- azul = Européia
- vermelho: Africana
- verde: Ameríndia
- rosa: Grupo DM1A
- amarelo: Grupo - controle

Tabela 5 – Contribuição de ascendência estimada nos grupos de pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles normais

Grupos	Ancestralidade		
	Européia	Africana	Ameríndia
Controle	0,715	0,206	0,079
DM 1 A	0,773	0,154	0,073

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune

A.

B.

Figura 4 - Representações gráficas das contribuições de ascendência individuais geradas pelo *software Structure*, assumindo $k = 3$ populações. A) *Bar plot* exibindo as contribuições Africana (vermelho), Européia (azul) e Ameríndia (verde). Cada coluna representa um indivíduo, que é agrupado em suas populações. Os três grupos do primeiro *bar-plot* representam as populações parentais (europeus, africanos e ameríndios), usadas para ajudar o *software* a estimar a ascendência dos indivíduos miscigenados; B) *Tri-plot* mostrando populações parentais agrupadas nos vértices e casos e controles espalhados no triângulo de acordo com suas ancestralidades. Cada círculo representa um indivíduo. Portadores de diabetes tipo 1 A estão em rosa, e controles em amarelo.

6.4 Genes do Sistema HLA

Em nossa casuística obtivemos 21 alelos HLA-DR, 16 alelos HLA-DQ e 36 haplótipos HLA-DR/DQ, com frequências iguais ou superiores a 0,4%. A distribuição dos alelos HLA-DR e -DQ está demonstrada nas tabelas 6 e 7, a dos genótipos HLA-DR/DR na tabela 8, e a dos haplótipos HLA-DR/DQ na tabela 9.

Os alelos, genótipos e haplótipos do sistema HLA foram avaliados assumindo que não há estratificação e também corrigindo para efeitos de estratificação, pelo programa STRAT.

Os alelos HLA-DRB1*0301, -*0401, -*0402, -*0405 e -*09 predominaram no grupo DM1A e os alelos HLA-DRB1*0302, -*07, -*10, -*11, -*13, -*14, -*15 predominaram no grupo controle. Quando corrigidos para estratificação, os alelos de susceptibilidade continuaram conferindo risco, o mesmo ocorrendo com os alelos de proteção, exceto o alelo -*16 que passou a ser protetor após correção (p no-structured 0,0024, p structured 0,001), conforme tabela 6. Os alelos DRB1*01, *0403, *0404, *0407, *0408, *0411, *08 e *012 permaneceram como neutros.

Em relação aos alelos HLA-DQ; DQB1*0201 e DQB1*0302 foram os de maior predisposição, enquanto DQB1*0402, -*0501, -*0503, -*0602 e -*0603 foram protetores. Após correção pelo STRAT-software, o alelo DQB1*0201 continuou sendo de susceptibilidade, bem como DQB1*0302. O alelo DQB1*0501 deixou de ser protetor (p no-structured 0,0014, p structured 0,007),

enquanto os alelos DQB1*0402, -*0503, -*0602 e -*0603 continuaram protetores, tabela 7.

Os alelos DRB1*03 e/ou -*04 e DQB1*0201 e/ou -*0302 estiveram presentes em 84,6% e 80,9% dos pacientes com DM1A.

Quando avaliamos os genótipos (tabela 8), temos que o maior risco para DM1A foi conferido pelos genótipos HLA-DR3/DR4 (OR=16,5) em 23,9% da população, seguido por –DR3/DR3 (OR=8,9) em 8,7%, -DR4/DR4 (OR=4,7) em 6,0% e –DR3/DR9 (OR=4,9) em 2,6%. O alelo DR*03, quando associado a DRX (diferente de -*03, -*04 e *09), e o alelo DR*09, associado a DR*04, DRX ou em homozigose, foram neutros. Apenas o alelo -*04 conferiu risco para DM1 mesmo quando associado a DRX.

A proteção para DM1A foi obtida pela ausência dos alelos HLA-DR3, DR4 e DR9 (OR=0,1).

Quando corrigido para estratificação, o HLA-DR3/DR4 continuou conferindo risco ($p<0,001$), seguido por –DR3/DR3 ($p<0,001$), DR3/DR9 ($p=0,002$), DR4/DR4 ($p<0,001$), e DR4/DRX ($p=0,002$).

A proteção para DM1A conferida pela ausência dos alelos HLA-DR3, DR4 e DR9, permaneceu após correção para estratificação ($p<0,001$).

Os haplótipos DRB1*0301/DQB1*0201, -*0401/0302, -*0402/0302, -*0405/0302, -*09/0202 predominaram no grupo DM1A, enquanto -*0302/0402, -*07/0202, -*10/0501, -*11/0301, -*11/0602, -*13/0603, -*14/0503 e -*15/0602 conferiram proteção. Todos os haplótipos de susceptibilidade e proteção foram mantidos após a correção pelo STRAT-*software*, exceto o -*07/0201, inicialmente neutro e foi incluído como haplótipo protetor após estratificação (p *no-structured* 0,0029, p *structured* 0,001).

Tabela 6 – Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com diabetes tipo 1 A e controles normais

Alelos	DM1A n (%)	Controles n (%)	OR	IC95%	<i>p no-structured</i>	<i>p structured</i>
01	119 (8,5%)	158 (10,5%)	0,79	(0,62 a 1,02)	0,0662	0,108
301	400 (28,7%)	121 (8,1%)	4,58	(3,68 a 5,69)	<0,0001	<0,001
302	1 (0,1%)	20 (1,3%)	0,05	(0,01 a 0,39)	<0,0001	<0,001
401	127 (9,1%)	52(3,5%)	2,79	(2,00 a 3,90)	<0,0001	<0,001
402	98 (7,0%)	27 (1,8%)	4,12	(2,67 a 6,35)	<0,0001	<0,001
403	7 (0,5%)	11(0,8%)	0,68	(0,26 a 1,76)	0,578	-----
404	38 (2,7%)	21 (1,4%)	1,97	(1,15 a 3,37)	0,0119	0,007
405	142 (10,2%)	18 (1,2%)	9,32	(5,68 a 15,31)	<0,0001	<0,001
407	3 (0,2%)	8 (0,5%)	0,40	(0,1 a 1,5)	0,1639	0,1345
408	4 (0,3%)	7 (0,5%)	0,61	(0,2 a 2,1)	0,4310	0,5316
411	3 (0,2%)	9 (0,6%)	0,36	(0,09 a 1,32)	0,186	0,1070
07	79 (5,7%)	177 (11,8%)	0,45	(0,34 a 0,59)	<0,0001	<0,001
08	47 (3,4%)	85 (5,7%)	0,58	(0,40 a 0,83)	0,0030	0,012
09	51 (3,7%)	21 (1,4%)	2,67	(1,59 a 4,46)	<0,0001	<0,001
10	10 (0,7%)	33 (2,2%)	0,32	(0,16 a 0,65)	0,0010	0,002
11	53 (3,8%)	159 (10,6%)	0,33	(0,24 a 0,46)	<0,0001	<0,001
12	13 (0,9%)	24 (1,6%)	0,58	(0,29 a 1,14)	0,1093	0,168
13	93 (6,7%)	207 (13,8%)	0,45	(0,34 a 0,58)	<0,0001	<0,001
14	14 (1,0%)	70 (4,7%)	0,21	(0,12 a 0,37)	<0,0001	<0,001
15	28 (2,0%)	177 (11,8%)	0,15	(0,10 a 0,23)	<0,0001	<0,001
16	28 (2,0%)	59 (3,9%)	0,50	(0,32 a 0,79)	0,0024	0,001
Outros	45 (3,2%)	51 (3,4%)	—	—	—	—
Total	1396	1500				

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança, *p no-structured*= nível de significância antes da correção pelo STRAT, *p structured*= nível de significância após correção pelo STRAT.

Foram incluídos 21 alelos, com número superior ou igual a 10 (0,4%), em pacientes e controles. *P* corrigido pelo método de Bonferroni < 0,0023. Os alelos raros estão em outros.

Tabela 7 – Distribuição dos alelos HLA-DQB1 em pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles normais

Alelos	DM1A n (%)	Controles n (%)	OR	IC95%	<i>p no-structured</i>	<i>p structured</i>
201	423 (30,8%)	156 (11,2%)	3,52	(2,88 a 4,31)	<0,0001	<0,001
202	94 (6,9%)	136 (9,8%)	0,68	(0,51 a 0,89)	0,0051	0,008
301	140 (10,2%)	189 (13,6%)	0,72	(0,57 a 0,91)	0,0057	0,003
302	371 (27,0%)	139 (10,0%)	3,33	(2,69 a 4,12)	<0,0001	<0,001
303	27 (2,0%)	32 (2,3%)	0,85	(0,51 a 1,43)	0,5399	0,739
319	1 (0,1%)	11 (0,8%)	0,091	(0,012 a 0,708)	0,0041	0,0052
401	5 (0,4%)	6 (0,4%)	0,84	(0,26 a 2,77)	0,7773	—
402	32 (2,3%)	81 (5,8%)	0,38	(0,25 a 0,58)	<0,0001	<0,001
501	134 (9,8%)	190 (13,7%)	0,68	(0,54 a 0,86)	0,0014	0,007
502	30 (2,2%)	51 (3,7%)	0,59	(0,37 a 0,93)	0,0206	0,010
503	7 (0,5%)	40 (2,9%)	0,17	(0,08 a 0,39)	<0,0001	<0,001
601	6 (0,4%)	8 (0,6%)	0,76	(0,26 a 2,19)	0,6071	0,454
602	30 (2,2%)	201 (14,5%)	0,13	(0,09 a 0,19)	<0,0001	<0,001
603	16 (1,2%)	90 (6,5%)	0,17	(0,09 a 0,29)	<0,0001	<0,001
604	47 (3,4%)	39 (2,8%)	1,23	(0,79 a 1,89)	0,3518	0,691
609	4 (0,3%)	12 (0,9%)	0,335	(0,108 a 1,042)	0,0474	
Outros	10 (0,7%)	30 (2,2%)				
Total	1372	1388				

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança, *p no-structured*= nível de significância antes da correção pelo STRAT, *p structured*= nível de significância após correção pelo STRAT.

Foram incluídos 16 alelos, com número superior ou igual a 10 (0,4%), em pacientes e controles. *P* corrigido pelo método de Bonferroni < 0,003. Os alelos raros estão em outros.

Tabela 8 - Distribuição dos genótipos HLA-DRB1/DRB1 de risco dos pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles normais

Genótipos	DM1A n (%)	Controles n (%)	OR	IC95%	<i>p no-structured</i>	<i>p structured</i>
DR3/DR3	61 (8,7%)	8 (1,1%)	8,88	(4,22 a 18,70)	<0,0001	<0,001
DR3/DR4	167 (23,9%)	14 (1,9%)	16,53	(9,48 a 28,85)	<0,0001	<0,001
DR3/DR9	18 (2,6%)	4 (0,5%)	4,94	(1,66 a 14,66)	0,0015	0,002
DR3/DRX	110 (15,8%)	120 (16,0%)	0,98	(0,74 a 1,30)	0,9004	0,802
DR4/DR4	42 (6,0%)	10 (1,3%)	4,74	(2,36 a 9,52)	<0,0001	<0,001
DR4/DR9	12 (1,7%)	5 (0,7%)	2,61	(0,91 a 7,44)	0,0632	0,105
DR4/DRX	181 (25,9%)	137 (18,3%)	1,57	(1,22 a 2,01)	0,0004	0,002
DR9/DR9	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,2998	---
DR9/DRX	19 (2,7%)	12 (1,6%)	1,72	(0,83 a 3,57)	0,1405	0,159
DRX/DRX	87 (12,5%)	440 (58,7%)	0,10	(0,078 a 0,13)	<0,0001	<0,001

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança, *p no-structured*= nível de significância antes da correção pelo STRAT, *p structured*= nível de significância após correção pelo STRAT.

P corrigido para o método de Bonferroni <0,005.

Tabela 9 - Distribuição dos haplótipos HLA DRB1-DQB1 em pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles normais

Haplótipos	DM1A n (%)	Controles n (%)	OR	IC95%	<i>p no-structured</i>	<i>p structured</i>
01 – 0501	114 (8,3%)	142 (10,2%)	0,79	(0,61 a 1,03)	0,0819	0,068
0301 – 0201	389 (28,4%)	109 (7,9%)	4,64	(3,69 a 5,83)	<0,0001	<0,001
0301 – 0202	7 (0,5%)	4 (0,3%)	1,77	(0,52 a 6,07)	0,3546	—
0302 – 0402	0 (0,0%)	17 (1,2%)	—	—	<0,0001	<0,001
0401 – 0301	18 (1,3%)	7 (0,5%)	2,62	(1,09 a 6,29)	0,0251	0,107
0401 – 0302	105 (7,7%)	40 (2,9%)	2,79	(1,92 a 4,05)	<0,0001	<0,001
0402 – 0301	11 (0,8%)	2 (0,1%)	5,60	(1,24 a 25,32)	0,0116	0,008
0402 – 0302	87 (6,3%)	23 (1,7%)	4,02	(2,52 a 6,40)	<0,0001	<0,001
0403 – 0302	4 (0,3%)	8 (0,6%)	0,50	(0,152 a 1,679)	0,2555	0,2643
0404 – 0302	32 (2,3%)	16 (1,2%)	2,05	(1,12 a 3,75)	0,0178	0,002
0405 – 0302	110 (9,9%)	17 (1,2%)	8,16	(4,89 a 13,60)	<0,0001	<0,001
0411 – 0302	3 (0,2%)	8 (0,6%)	0,38	(0,100 a 1,428)	0,1359	0,1367
07 – 0201	16 (1,2%)	38 (2,7%)	0,42	(0,23 a 0,75)	0,0029	0,001
07 – 0202	55 (4,0%)	109 (7,9%)	0,49	(0,35 a 0,68)	<0,0001	<0,001
08 – 0301	3 (0,2%)	12 (0,9%)	0,25	(0,07 a 0,89)	0,0210	0,067
08 – 0402	29 (2,1%)	58 (4,2%)	0,49	(0,31 a 0,78)	0,0019	0,004
09 – 0202	25 (1,8%)	6 (0,4%)	4,27	(1,75 a 10,45)	0,0005	<0,001
09 – 0303	17 (1,2%)	7 (0,5%)	2,47	(1,02 a 5,99)	0,0376	0,234
10 – 0501	10 (0,7%)	32 (2,3%)	0,31	(0,15 a 0,63)	0,0007	<0,001
11 – 0301	44 (3,2%)	92 (6,6%)	0,47	(0,32 a 0,67)	<0,0001	<0,001
11 – 0602	0 (0,0%)	27 (1,9%)	—	—	<0,0001	<0,001
12 – 0301	12 (0,9%)	19 (1,4%)	0,64	(0,31 a 1,31)	0,2180	0,457
13 – 0301	6 (0,4%)	16 (1,2%)	0,38	(0,147 a 0,965)	0,0346	0,0354
13 – 0303	3 (0,2%)	16 (1,2%)	0,19	(0,055 a 0,646)	0,0030	0,0041
13 – 0602	13 (0,9%)	15 (1,1%)	0,88	(0,41 a 1,85)	0,7270	0,582
13 – 0603	17 (1,2%)	86 (6,2%)	0,19	(0,11 a 0,32)	<0,0001	<0,001
13 – 0604	46 (3,4%)	38 (2,7%)	1,23	(0,79 a 1,91)	0,3470	0,749
13 – 0609	3 (0,2%)	12 (0,9%)	0,25	(0,071 a 0,892)	0,0210	0,0321
14 – 0301	1 (0,1%)	9 (0,6%)	0,11	(0,01 a 0,88)	0,0119	—
14 – 0501	3 (0,2%)	9 (0,6%)	0,34	(0,09 a 1,24)	0,0862	—
14 – 0503	7 (0,5%)	38 (2,7%)	0,18	(0,08 a 0,41)	<0,0001	<0,001
15 – 0601	4 (0,3%)	7 (0,5%)	0,58	(0,17 a 1,97)	0,3750	—
15 – 0602	17 (1,2%)	152 (11,0%)	0,10	(0,06 a 0,16)	<0,0001	<0,001
16 – 0301	3 (0,2%)	14 (1,0%)	0,21	(0,06 a 0,75)	0,0080	0,005
16 – 0502	25 (1,8%)	42 (3,0%)	0,59	(0,36 a 0,98)	0,0399	0,012
Outros	124 (9,04%)	189 (13,6%)				
Total	1372	1388				

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança, *p no-structured*= nível de significância antes da correção pelo STRAT, *p structured*= nível de significância após correção pelo STRAT.

Foram incluídos 35 haplótipos, com número superior ou igual a 10 (0,4%), em pacientes e controles. *P* corrigido pelo método de Bonferroni < 0,0014. Os alelos raros estão em outros.

6.5 *INS-VNTR* - Locus IDDM2; Cr 11p15

O genótipo *INS VNTR* I/I prevaleceu nos pacientes diabéticos (60,7%) em relação à população-controle (32,2%), conferindo razão de chance para DM1A de 3,25.

Tabela 10 - Distribuição dos genótipos dos alelos classe I e classe III do *INS VNTR* em pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles normais

Genótipos	DM1A n (%)	Controles n (%)	OR	IC	P
I/I	284 (60,7%)	120 (32,2%)	3,25	2,44 a 4,33	<0,0001
I/III + III/III	184 (39,3%)	253 (67,8%)			
Total	468	373			

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança.

6.6 Polimorfismo do gene *PTPN22* - 1858CT; Cr 4q26

O genótipo ct + tt predominou nos pacientes com diabetes (19,0%) em relação aos controles (10,6%) - $p < 0,0001$, conferindo susceptibilidade para a doença (OR = 1,97).

Tabela 11– Distribuição dos genótipos do polimorfismo do gene *PTPN22* - 1858CT em pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles normais

Genótipos	DM1A n (%)	Controles n (%)	OR	IC	P
cc	375 (81%)	614 (89,4%)			
ct + tt	88 (19,0%)	73 (10,6%)	1,97	1,40 a 2,75	P<0,0001
Total	463	687			

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança.

6.7 Polimorfismos A>G na posição +49 do Gene *CTLA4*; Cr 2q33 -

A frequência do polimorfismo na posição +49 A>G no gene *CTLA4* foi semelhante nos pacientes com DM1A (54,5%) e controles (55%).

Tabela 12 – Distribuição dos genótipos do polimorfismo rs231775A>G do gene *CTLA4* em pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles normais

Genótipos	DM1A n (%)	Controles n (%)	OR	IC	P
aa	296 (45,5%)	276 (45,0%)			
ag+gg	355 (54,5%)	338 (55,0%)	1,02	0,81 a 1,27	0,85
Total	651	614			

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança.

6.8 Correção para efeitos de estratificação das variantes polimórficas dos genes *INS-VNTR*, *PTPN22* e *CTLA4* relacionados ao DM1 A

O grau de significância (p) dos testes de associação, considerando 95% de confiança, assumindo que não há estratificação e corrigindo para efeitos de estratificação, obtidos pelo programa STRAT, estão demonstrados na tabela 13.

Tabela 13- Freqüências genotípicas das variantes polimórficas relacionadas ao DM1A, estimadas para os pacientes e controles; p obtido a partir do teste de associação assumindo que não há estrutura populacional e após a correção para a estratificação

Genes	Genótipos	DM1A n (%)	Controles n (%)	OR	IC	p structured	p no- structured
<i>INS-VNTR</i>	I/I	284 (60,7%)	120 (32,2%)	3,25	2,44 a 4,33	<0,0001	<0,001
	I/III + III/III	184 (39,3%)	253 (67,8%)				
	cc	375 (81%)	614 (89,4%)				
<i>PTPN 22</i> (-1858 CT)	ct+tt	88 (19,0%)	73 (10,6%)	1,97	1,40 a 2,75	<0,0001	<0,001
<i>CTLA4</i> (+49 A/G)	aa	296 (45,5%)	276 (45,0%)	----	----	----	----
	ag + gg	355 (54,5%)	338 (55,0%)				

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n=número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança, p no-structured= nível de significância antes da correção pelo STRAT, p structured= nível de significância após correção pelo STRAT, *INS-VNTR*=variação no número de repetições de nucleotídeos 5' do gene da insulina, *PTPN22*=proteína tirosina-fosfatase não receptor tipo 22, *CTLA4*=cytotoxic T-lymphocyte antigen 4.

Os genótipos do gene *CTLA4* estavam fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos controles ($p=0,0001$) e foram excluídos de análises posteriores; enquanto os dos genes *PTPN-22* e *INS-VNTR* estavam em equilíbrio de Hardy-

Weinberg, tanto para população-controle quanto para os diabéticos. Os genótipos *INS VNTR* I/I e *PTPN22* CT+TT, que predominaram nos pacientes com diabetes (60,7% e 19,0%) em relação à população-controle (32,2% e 10,6%, respectivamente), conferindo susceptibilidade para a doença (OR = 3,25 e 1,97, respectivamente), permaneceram de risco após correção para estratificação ($p < 0,001$).

7. Discussão

Diabetes tipo 1 A é uma doença complexa, marcada pela destruição progressiva das células β pancreáticas, resultado de um processo de autoimunidade, que inclui tanto fatores genéticos quanto ambientais.³

Vários genes estão implicados na susceptibilidade ao Diabetes tipo 1 A em populações caucasianas, incluindo os alelos -DR e -DQ do sistema HLA-II, que provêm 40-50% de risco,⁶ bem como os polimorfismos do *PTPN22*, *CTLA4* e da variação do número de repetições de nucleotídeos 5' do gene da insulina (*INS-VNTR*).

Em relação ao Brasil, estudos evidenciam que a frequência desses alelos e polimorfismos de predisposição para Diabetes Mellitus tipo 1 e o risco por eles conferido, têm diferenças inter-regionais, bem como diferenças em relação às populações referidas como caucasianas de outros países,³ reforçando a necessidade de ampliação de estudos de predisposição genética em nosso meio para definir melhor as variantes causais e as relacionadas à ancestralidade.

É sabido que parte dessas diferenças entre as casuísticas pode advir da grande heterogeneidade das populações e, a estratificação populacional, que é característica do Brasil, pode estabelecer um viés quando se avalia os marcadores genéticos de causalidade à doença. Há poucos estudos avaliando marcadores genéticos nos portadores de DM1A no Brasil e, em nenhum desses, houve caracterização genética de ancestralidade, nem tão pouco correção para a estratificação populacional.

A cor da pele é amplamente utilizada em estudos clínicos como um fenótipo próximo à ancestralidade genômica, porém, a população brasileira é altamente miscigenada, de forma que em estudos prévios,^{1,2} com diferentes

amostras, uma fraca correlação foi percebida entre cor e ancestralidade genômica nos brasileiros.

Para caracterizar melhor a miscigenação da nossa população, procedemos à análise de ancestralidade através da genotipagem de 93 marcadores autossômicos (AIMs) e posterior avaliação desses resultados pelo programa *Structure*. Para verificar se as diferenças nas frequências dos alelos, genótipos e haplótipos dos genes relacionados ao diabetes mellitus tipo 1 A se mantêm mesmo após correção para o viés de estratificação da nossa população, foram realizados testes de associação com o programa STRAT⁴⁹, que consiste em uma abordagem estatística de mapeamento de associação dos genes candidatos em populações estruturadas.

No presente estudo, evidenciamos que, nossa população é, de fato, resultado de três grandes raízes ancestrais: ameríndios, europeus e africanos; provavelmente refletindo grandes marcos de nossa história: a colonização européia em terras indígenas e a escravidão africana, sendo que obtivemos maior percentual de ascendência européia, tanto no grupo DM1A quanto em controles (77% e 71%, respectivamente), o que corrobora dados de estudos prévios relacionados à ancestralidade brasileira^{2,83}.

Da casuística de 915 diabéticos tipo 1 autoimune (24,1±13 anos) e 789 controles (28,5±1,5 anos), verificou-se, em relação ao gênero, maior percentual de mulheres no grupo DM1A (57,6% mulheres *versus* 39,5% homens). Mattana TCC e cols. também havia observado maior prevalência de mulheres na população com DM1A em São Paulo, associada à presença do alelo T da variante rs763361 do *CD226*⁷¹, bem como Gomes MB e cols. que também evidenciou maior percentual de mulheres em estudo multicêntrico.⁹¹

Em uma subanálise, não houve diferença na distribuição dos alelos HLA-DRB1 e -DQB1 em relação ao sexo, portanto essa maior frequência de mulheres em nossa casuística talvez se deva a outros polimorfismos como a variante rs763361 do *CD226*, como sugerido por Mattana TCC e cols.⁷¹

Vale lembrar que, na maioria das casuísticas, não há diferenças com relação ao sexo, exceto em populações como Sardenha (Itália), Oxford (U.K) e Santa-fé de Bogotá (Colômbia), nas quais o percentual de homens com diabetes tipo 1 é maior.⁷²

A idade de diagnóstico do DM1A ($12,3 \pm 8,4$ anos) foi semelhante à observada em populações caucasianas⁶. Quando comparado aos controles, a média de IMC foi inferior no grupo dos diabéticos. Os pacientes também tiveram maiores valores de glicemia e maior frequência e títulos de autoanticorpos pancreáticos, como esperado.

Em relação à cor autorreferida, a cor branca foi a mais prevalente nos dois grupos; entretanto, no grupo diabetes, houve maior frequência de brancos (81,7% x 65,6% - $p < 0,0001$), e menor frequência de pardos (15,4% x 27,8% - $p < 0,0001$) e de negros (2,4% x 5,9% - $p = 0,0003$), em relação ao controle.

Na análise genética inicial, os alelos HLA-DRB1*0403, -*0411, -*01 e -*12 foram neutros, enquanto os alelos -*0301, -*0401, -*0402, -*0405 e -*09 predominaram no grupo DM1A e os alelos -*0302, -*07, -*10, -*11, -*13, -*14 e -*15 conferiram proteção. O alelo -*08 com efeito protetor na maioria das casuísticas⁸⁴, mostrou tendência semelhante na nossa população, porém não significativo, talvez por sua baixa frequência. A proteção conferida pelos alelos HLA-DRB1*07 foi observada em alguns, mas não em todos os estudos realizados no Brasil, por casuística insuficiente ou eventuais diferenças

genéticas regionais. O DRB1*09, por sua vez, neutro para os europeus, é de susceptibilidade para os africanos,⁹⁰ como também o foi em nossa casuística, apesar de ter sido pouco prevalente (3,7% dos casos e 1,4% dos controles).

Em relação aos alelos HLA-DQ; DQB1*0201 e DQB1*0302 conferiram risco e DQB1*0402, -*0503, -*0602 e DQB1*0603 foram protetores. Embora o DQB1*0301 tenha demonstrado tendência de associação com proteção na nossa casuística ($p=0,0057$), esta não foi significativa. Em uma metanálise, este mesmo alelo foi causal em dois estudos de populações da Suécia e Reino Unido, porém protetor na Finlândia, Hungria, Itália e região da Sardenha⁸⁴.

Muito se estuda a respeito dos mecanismos pelo qual esses alelos conferem risco ou proteção. A molécula de classe II DQB1 0302, diferentemente de DQB1 0301, não contém o ácido aspártico na posição 57; a falta do resíduo nessa posição, parece ser o mecanismo envolvido na susceptibilidade ao DM1⁸⁵. As moléculas HLA-DQ codificadas pelo protetor DQB1*0602 e predisponente DQB1*0302, parecem diferir nas suas especificidade e afinidade aos peptídeos da insulina, GAD e IA2.

Sobre os genótipos, o maior risco para DM1A foi conferido pelos genótipos HLA-DR3/DR4 (OR=16,5) em 23,9% da população, seguido por –DR3/DR3 (OR=8,9) em 8,7%, -DR4/DR4 (OR=4,7) em 6,0% e –DR3/DR9 (OR=4,9) em 2,6%. Cerca de 84,7% dos pacientes eram portadores dos alelos DR3 ou DR4, *versus* 39,7% dos controles, evidenciando a forte predisposição associada aos alelos HLA-DR3 e –DR4.

Apenas o alelo DR4 conferiu risco independente, mesmo quando associado aos alelos protetores, sugerindo importante papel na susceptibilidade ao diabetes. Estudos prévios já sugeriram o impacto destes alelos na

predisposição ao DM1A. A associação DR4/DR9 não conferiu susceptibilidade como seria esperado, já que alberga dois alelos de risco, talvez pela pequena casuística composta por apenas 12 pacientes e 5 controles. A ausência dos alelos HLA-DR3, DR4 e DR9 foi associada ao menor risco para DM1A (OR=0,1), o que ocorreu com 58,7% da população controle e em apenas 12,5% dos pacientes.

Dentre os haplótipos, DRB1*0301/DQB1*0201, -*0401/0302, -*0402/0302, -*0405/0302, -*09/0202 predominaram no grupo DM1A, enquanto -*0302/0402, -*07/0202, -*10/0501, -*11/0301, - 11/0602, -*13/0603, -*14/0503 e -*15/0602 conferiram proteção.

Os genes que codificam as proteínas clássicas HLA são os mais polimórficos do genoma humano. Foram reportados cerca de nove mil cento e cinquenta e quatro alelos, codificadores de seis diferentes proteínas clássicas HLA, sendo que os alelos, haplótipos e genótipos de susceptibilidade ao DM1A diferem muito entre os caucasianos, latinos e afro-americanos. Isto torna as populações latino e afro-americanas, cuja diversidade dos haplótipos é muito maior que a dos europeus, amostras adequadas para se estudar alelos, genótipos e haplótipos que prevalecem em não-caucasianos.⁸⁹

Dentre os haplótipos nos afro-americanos, DRB1*0302-DQB1*0402 (DR3) foi tido como protetor e DRB1*0301-DQB1*0201 (DR3) e DRB1*0901-DQB1*0202 (DR9) de susceptibilidade; corroborando nossos dados.⁸⁶ Tanto em europeus quanto em africanos, os haplótipos DRB1*0301-DQB1*0201 (ou -*0202), DRB1*0405-DQB1*0302 e DRB1*0401-DQB1*0302 também conferem susceptibilidade, e DRB1*1501-DQB1*0602 e DRB1*1401-DQB1*0503, proteção, o que também coincide com nossos dados.⁸⁹

Apesar do alelo -DRB1*0701 ser protetor para os europeus e na nossa população, o haplótipo DQB1*0701-DQB1*0202 é de susceptibilidade para os africanos, ao contrário do observado em nossa população.⁹⁰

Os haplótipos DRB1*10-DQB1*0501, -*11-0602 e -*13-0603 foram protetores na nossa casuística e na população afro-americana, diferentemente do comportamento neutro nos caucasianos.^{89,90}

Sendo a população brasileira altamente miscigenada, algum grau de desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg é esperado. Por essa razão, as análises de desvio de Hardy-Weinberg foram realizadas para todos os alelos (sistema HLA) e polimorfismos candidatos em toda a amostra. Dos principais polimorfismos relacionados ao DM1A, o único que estava fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os controles foi o do gene *CTLA4* (+49 A/G), o que impossibilitou outras análises.

O genótipo *INS VNTR* I/I prevaleceu nos pacientes portadores de diabetes (60,7%) em relação à população-controle (32,2%), conferindo risco relativo para DM1A de 3,25. Em outro estudo realizado também em São Paulo, Hauache OM e cols.,⁷³ em menor número de pacientes, observou o genótipo -2221CC do gene da insulina (polimorfismo -2221C/T) em maior frequência na população, compreendendo 83,1% dos pacientes com diabetes e 69,3% dos controles (OR=1,98), com resultados mais próximos aos observados em populações caucasianas.

A frequência destes alelos difere entre grupos raciais. Undlien DE e cols.⁷⁴ demonstrou que os alelos de classe I conferiam susceptibilidade ao DM1A na população caucasiana, e não nos negros e japoneses.

O genótipo CT + TT da variante 1858C/T do *PTPN22* predominou nos pacientes com DM1A (19%) em relação aos controles (10,6%) - $p < 0,0001$, conferindo susceptibilidade (OR = 1,97). A predisposição foi observada apenas em população de cor autorreferida branca, possivelmente porque o alelo T é muito raro na população afro-americana e asiática.^{75,76}

Nossos resultados também diferem dos de populações caucasianas (EUA e Finlândia), em que os genótipos de risco estavam presentes em 26,8 a 42,1% dos pacientes e 16,5 a 25,3% dos controles.¹⁸

Verificamos ainda que o polimorfismo na posição +49 A>G no gene *CTLA4* foi observado em 54,5% dos pacientes DM tipo 1 A e 55% do grupo-controle. A literatura reporta sua predisposição em pacientes diabéticos da Itália, Reino Unido e Estados Unidos, mas não da Alemanha.¹⁷

Em uma subanálise dos polimorfismos de risco e correlações de cor autorreferida, nesse estudo, observamos que a cor autorreferida branca predominou nos grupos com genótipos de risco I/I (gene *INS-VNTR*), ct+tt (gene *PTPN22*) e ag+gg (gene *CTLA4*) para o DM1A, seguido pelas cores parda e negra (suplemento 3).

No presente estudo, evidenciamos que, nossa população é, de fato, resultado de três grandes raízes ancestrais: ameríndios, europeus e africanos; provavelmente refletindo grandes marcos de nossa história: a colonização européia em terras indígenas e a escravidão africana. Coube aos europeus o maior índice de contribuição genética, o que já havia sido demonstrado em estudo que incluiu as várias regiões do país.² De fato, tanto no grupo de pacientes com diabetes tipo 1 A, quanto nos controles, a ancestralidade européia prevaleceu, seguida pela africana e indígena.

Esta grande diversidade étnica resultou em características genéticas intermediárias entre as dos caucasianos e africanos, contribuindo com a presença de variantes de risco e proteção para o DM1A parcialmente discordantes nesses grupos.

A predisposição ao DM1 conferida pelos alelos *HLA-DR3* e *DR4* e polimorfismos do *PTPN22* e *INS-VNTR*, presente naquelas populações, também foi confirmada na nossa casuística. Os alelos e polimorfismos de risco continuaram mostrando menor frequência quando comparados à população caucasiana de países como Alemanha, Bélgica, Inglaterra⁹² e frequência semelhante quando comparados a outras casuísticas brasileiras⁹³, independente da característica de miscigenação da nossa população.

Já o alelo *HLA-DR*9*, de risco, e os haplótipos *DRB1*10-DQB1*0501*, -**11-0602* e -**13-0603* de proteção, observados por nós, foram reportados em afro-americanos mas não em caucasianos.

A correção para a estratificação populacional, além de aumentar o poder estatístico de nossa análises e reforçar os resultados obtidos, permitiu evidenciar a associação do alelo *HLA-DRB1*16* e do haplótipo -**07/0201* com proteção ao DM1A e definiu o alelo *DQB1*0501* como neutro.

8. Conclusão

- A população em estudo é formada por três grandes raízes ancestrais; ameríndios, europeus e africanos, sendo dos europeus o maior índice de contribuição genética (77% e 71%, grupo DM1A e controles, respectivamente), em conformidade com estudos de várias regiões do país.
- Os principais alelos HLA- DR e DQ, variante do *PTPN22* 1858T e alelos classe I do *INS-VNTR* associados a risco ao DM1A foram confirmados na nossa casuística. Os haplótipos DRB1*0301/DQB1*0201, -*0401/0302, -*0402/0302, -*0405/0302, -*09/0202 também predominaram no grupo DM1A.
- A correção pela ancestralidade evidenciou o alelo DRB1*16 e o haplótipo -*07/0201 como de proteção ao DM1A e o DQB1*0501, inicialmente de proteção, como neutro. Também confirmou o haplótipo -*09/0202, como de risco e os haplótipos -*0302/0402 , -*10/0501, -*11/0602 e -*13/0603, como protetores na nossa população, à semelhança do observado em afro-americanos, mas não nos caucasianos.
- As frequências dos alelos e polimorfismos relacionados ao diabetes tipo 1A continuaram sendo menores que dados reportados de populações mais homogêneas que a nossa, provavelmente por diferenças no *background* genético entre elas.
- A correção para a estratificação populacional permite aumentar o poder estatístico da análise e reforçar os resultados obtidos, auxiliando na diferenciação de fatores causais dos decorrentes de estruturação dos

casos e controles, sendo indicada em estudos de populações miscigenadas como a nossa.

9. Anexos

Suplemento 1 - SNP Ancestry Informative Markers.

NCBI	SNP_Assay	Strand	Alelo 1	Alelo 2	Chr	Assembly	Sequence
rs10108270	C__30263561_10	Forward	A	C	8	36	4178201
rs10236187	C__328256_10	Forward	A	C	7	36	139093846
rs1040045	C__8767011_10	Forward	A	G	6	36	4692158
rs1040404	C__2985471_10	Reverse	A	G	1	36	166426514
rs10496971	C__30021395_20	Forward	G	T	2	36	145486413
rs10510228	C__9471400_10	Forward	A	G	3	36	2183832
rs10512572	C__30205773_20	Forward	A	G	17	36	67023694
rs10513300	C__30087237_20	Reverse	C	T	9	36	119170027
rs10839880	C__26880884_10	Forward	C	T	11	36	7806892
rs11227699	C__27162924_10	Forward	A	G	11	36	66655068
rs11652805	C__31084340_10	Reverse	C	T	17	36	60417613
rs12130799	C__32221116_10	Forward	A	G	1	36	55435960
rs12439433	C__1447138_10	Reverse	A	G	15	36	34007327
rs12544346	C__8237454_10	Forward	A	G	8	36	86611868
rs12629908	C__1508579_10	Reverse	A	G	3	36	122005406
rs12657828	C__3164411_10	Reverse	A	G	5	36	79121482
rs1296819	C__2618285_20	Forward	A	C	22	36	16456546
rs1325502	C__9030949_10	Forward	A	G	1	36	42132857
rs13400937	C__32187474_20	Forward	G	T	2	36	79718431
rs1369093	C__7511789_10	Reverse	C	T	4	36	73464055
rs1407434	C__7550746_10	Forward	A	G	1	36	184415655
rs1471939	C__8793707_20	Reverse	C	T	8	36	28997224
rs1513181	C__1519732_10	Reverse	A	G	3	36	190057690
rs1760921	C__8833162_10	Reverse	C	T	14	36	19887971
rs1837606	C__2910912_10	Reverse	C	T	11	36	15794713
rs1871428	C__1903207_10	Reverse	A	G	6	36	168408609
rs1950993	C__2789623_10	Forward	G	T	14	36	57308440
rs200354	C__2968151_20	Forward	G	T	14	36	98445074
rs2030763	C__443622_10	Reverse	A	G	3	36	181447421
rs2073821	C__16163355_10	Forward	C	T	9	36	134922943
rs2125345	C__15885530_10	Reverse	C	T	17	36	71293786
rs214678	C__2403618_10	Reverse	C	T	12	36	45963217
rs2306040	C__3069822_20	Reverse	C	T	9	36	92681020
rs2330442	C__11837185_10	Forward	A	G	7	36	42346596
rs2357442	C__16209136_20	Reverse	A	C	14	36	51677717

continua

continuação

NCBI	SNP_Assay	Strand	Alelo 1	Alelo 2	Chr	Assembly	Sequence
rs6541030	C__16226232_10	Reverse	C	T	6	36	51719429
rs2416791	C__16234767_10	Forward	A	G	12	36	11592755
rs2504853	C__16252570_10	Reverse	C	T	6	36	12643097
rs260690	C___790944_10	Forward	A	C	2	36	108946170
rs2627037	C__15900715_10	Forward	A	G	2	36	179314783
rs2702414	C__27311585_10	Reverse	A	G	4	36	179636517
rs2946788	C___302128_10	Reverse	G	T	11	36	23967106
rs2986742	C__16188366_10	Forward	C	T	1	36	6472963
rs3118378	C___7770343_10	Reverse	A	G	1	36	68622275
rs316598	C___2949512_10	Reverse	C	T	5	36	2417626
rs316873	C___722586_10	Reverse	C	T	1	36	240409127
rs32314	C___2270718_10	Reverse	C	T	7	36	32145649
rs3737576	C__27471358_10	Reverse	C	T	1	36	101482151
rs3745099	C__27472381_10	Reverse	A	G	19	36	57593717
rs3784230	C__2770233_10	Forward	A	G	14	36	104750100
rs385194	C___1121830_10	Reverse	A	G	4	36	85528102
rs3907047	C___8948366_10	Forward	C	T	20	36	53434321
rs3943253	C__11860358_10	Reverse	A	G	8	36	13403871
rs4463276	C___493379_10	Forward	A	G	6	36	145097024
rs4666200	C__27891561_10	Forward	A	G	2	36	29391915
rs4670767	C__27978607_10	Forward	G	T	2	36	37794900
rs4717865	C__11448835_10	Reverse	A	G	7	36	73092135
rs4746136	C__27913671_10	Forward	A	G	10	36	74971000
rs4781011	C__11293224_10	Forward	G	T	16	36	10882812
rs4821004	C__2465604_1_	Forward	C	T	22	36	30696359
rs4908343	C__2494120_10	Reverse	A	G	1	36	27804285
rs4918842	C__3001048_10	Reverse	C	T	10	36	115306802
rs4984913	C__27950884_10	Forward	A	G	16	36	680467
rs5768007	C__29548230_10	Reverse	C	T	22	36	46586536
rs6422347	C__29040411_10	Forward	C	T	5	36	177795689
rs6451722	C__2938090_10	Forward	A	G	5	36	43747135
rs4951629	C__2662380_10	Reverse	C	T	7	36	151504786
rs647325	C___778913_10	Reverse	A	G	1	36	18043473
rs6548616	C__29071253_10	Reverse	C	T	3	36	79482265
rs705308	C__2637064_10	Reverse	A	C	7	36	97533299
rs7238445	C__28994653_10	Forward	A	G	18	36	48035542
rs731257	C___14517_10	Forward	A	G	7	36	12635776
rs734873	C___788020_10	Forward	A	G	3	36	149233045
rs7421394	C__31183706_10	Reverse	A	G	2	36	14673800
rs7554936	C__26139689_10	Reverse	C	T	1	36	149389113
rs7657799	C__29422763_10	Forward	G	T	4	36	105594872
rs772262	C___8340116_10	Forward	A	G	12	36	54450001

continua

NCBI	SNP_Assay	Strand	Alelo 1	Alelo 2	Chr	Assembly	Sequence
rs7745461	C__29245583_10	Forward	A	G	6	36	22019595
rs7803075	C__2130393_10	Reverse	A	G	7	36	130392606
rs7844723	C__1552011_10	Reverse	C	T	8	36	122977684
rs798443	C__8914321_10	Forward	A	G	2	36	7885726
rs7997709	C__30127919_10	Reverse	C	T	13	36	33745737
rs8035124	C__486094_10	Reverse	A	C	15	36	89906712
rs8113143	C__2882928_10	Reverse	A	C	19	36	38344087
rs818386	C__1395556_10	Reverse	C	T	16	36	63964209
rs870347	C__3052139_10	Reverse	A	C	5	36	6898035
rs874299	C__9605053_10	Reverse	C	T	18	36	73185272
rs9319336	C__27328815_10	Forward	C	T	13	36	26522356
rs948028	C__8799834_10	Reverse	A	C	11	36	120149657
rs9522149	C__30502208_20	Reverse	C	T	13	36	110625168
rs9530435	C__27192660_10	Reverse	C	T	13	36	74891888
rs9809104	C__30049893_10	Reverse	C	T	3	36	39121433
rs9845457	C__1478361_10	Reverse	A	G	3	36	137397166

Modificado de 29

Destes 93 AIMS, os seguintes foram excluídos de nossa análise:

rs11652805, rs 4717865, rs6548616 e rs1950993, por terem apresentado uma baixa performance de genotipagem.

Suplemento 2 - Estudos de caracterização de populações baseados em marcadores de ancestralidade.

Autor e ano de estudo	Marcadores	N° de loci	N° de populações	N° de regiões	Variabilidade entre indivíduos dentro da população (%)	Variabilidade entre populações dentro da região (%)	Variabilidade entre regiões (%)
Barbujani et al, 1997	RFLPs	79	11	5	84,5	3,9	11,7
Barbujani et al, 1997	Microsatélites	30	14	5	84,5	5,5	10,0
Romualdi et al, 2002	Inserções Alu	21	32	5	82,9	8,2	8,9
Rosemberg et al, 2002	Microsatélites	377	52	5	93,2	2,5	4,3
Excoffier et al, 2003	Microsatélites	377	52	5	87,6	3,1	9,2
Bastos-Rodrigues et al, 2006	Indels	40	52	5	85,7	2,3	12,1

Modificado de 30.

Suplemento 3– Distribuição dos genótipos de risco e proteção para o diabetes tipo 1 A quanto à cor autorreferida

Variáveis	Genótipos	Branco n (%)	Negro n (%)	Pardo n (%)
<i>INS-VNTR</i>	I/I	329 (49,8%)	6 (22,2%)	52 (41,6%)
	I/III + III/III	332 (50,2%)	21 (77,8%)	73 (58,4%)
	Total	661	27	125
<i>PTPN 22</i>	cc	656 (84,2%)	49 (96,1%)	237 (88,8%)
	ct + tt	123 (15,8%)	2 (3,9%)	30 (11,2%)
	Total	779	51	267
<i>CTLA4 (+49 A/G)</i>	aa	402 (44,3%)	30 (53,6%)	124 (49,0%)
	ag+gg	506 (55,7%)	26 (46,4%)	129 (51,0%)
	Total	908	56	253

n= número de indivíduos, *INS-VNTR*=variação no número de repetições de nucleotídeos 5' do gene da insulina, *PTPN22*=proteína tirosina-fosfatase não receptor tipo 22, *CTLA4*=cytotoxic T-lymphocyte antigen 4.

Suplemento 4 – Distribuição dos alelos HLA-DRB1 nos pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles normais

Alelos	DM1A	Controles	OR	IC95%	P
1	119 (8,5%)	158 (10,5%)	0,79	(0,6 a 1,0)	0,0662
101	19 (1,4%)	13 (0,9%)	1,58	(0,8 a 3,2)	0,2035
102	7 (0,5%)	3 (0,2%)	2,51	(0,6 a 9,7)	0,1670
103	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,2998
3	417 (29,9%)	154 (10,3%)	3,72	(3,0 a 4,6)	<0,0001
301	400 (28,7%)	121 (8,1%)	4,58	(3,7 a 5,7)	<0,0001
302	1 (0,1%)	20 (1,3%)	0,05	(0,01 a 0,4)	<0,0001
303	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,07	(0,07 ; 17,2)	0,9595
304	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,2998
305	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3346
307	6 (0,4%)	2 (0,1%)	3,23	(0,6 a 16,0)	0,1288
309	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3346
4	444 (31,8%)	176 (11,7%)	3,51	(2,9 a 4,3)	<0,0001
401	127 (9,1%)	52 (3,5%)	2,79	(2,0 a 3,9)	<0,0001
402	98 (7,0%)	27 (1,8%)	4,12	(2,7 a 6,3)	<0,0001
403	7 (0,5%)	11 (0,7%)	0,68	(0,3 a 1,8)	0,4275
404	38 (2,7%)	21 (1,4%)	1,97	(1,1 a 3,4)	0,0119
405	142 (10,2%)	18 (1,2%)	9,32	(5,7 a 15,3)	<0,0001
406	1 (0,1%)	2 (0,1%)	0,54	(0,05 a 5,9)	0,6060
407	3 (0,2%)	8 (0,5%)	0,40	(0,1 a 1,5)	0,1639
408	4 (0,3%)	7 (0,5%)	0,61	(0,2 a 2,1)	0,4310
409	2 (0,1%)	1 (0,1%)	2,15	(0,2 a 23,7)	0,5220
410	0 (0,0%)	2 (0,1%)	—	—	0,1723
411	3 (0,2%)	9 (0,6%)	0,36	(0,01 a 1,3)	0,1070
414	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3346
417	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3346
419	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,07	(0,07 a 17,2)	0,9595
423	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,2998
428	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3346
442	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3346
449	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3346
7	79 (5,7%)	177 (11,8%)	0,45	(0,3 a 0,6)	<0,0001
701	17 (1,2%)	15 (1,0%)	—	—	0,5754
8	47 (3,4%)	85 (5,7%)	0,58	(0,4 a 0,8)	0,0030
9	51 (3,7%)	21 (1,4%)	2,67	(1,6 a 4,5)	<0,0001
10	10 (0,7%)	33 (2,2%)	0,32	(0,2 a 0,6)	0,0010
11	53 (3,8%)	159 (10,6%)	0,33	(0,2 a 0,5)	<0,0001
12	13 (0,9%)	24 (1,6%)	0,58	(0,3 a 1,1)	0,1093
13	93 (6,7%)	207 (13,8%)	0,45	(0,3 a 0,6)	<0,0001
14	14 (1,0%)	70 (4,7%)	0,21	(0,1 a 0,4)	<0,0001
15	28 (2,0%)	177 (11,8%)	0,15	(0,1 a 0,2)	<0,0001
16	28 (2,0%)	59 (3,9%)	0,50	(0,3 a 0,8)	0,0024
801	12 (0,9%)	1 (0,1%)	12,99	(1,7 a 100,1)	0,0014
802	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3346
804	2 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,1425
901	13 (0,9%)	3 (0,2%)	4,69	(1,3 a 16,5)	0,0080
1001	2 (0,1%)	4 (0,3%)	0,54	(0,01 a 2,9)	0,4655
1100	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3346
1101	11 (0,8%)	4 (0,3%)	2,97	(0,9 a 9,3)	0,0508
1102	5 (0,4%)	2 (0,1%)	2,69	(0,5 a 13,9)	0,2183
1103	3 (0,2%)	0 (0,0%)	—	—	0,0724
1104	4 (0,3%)	2 (0,1%)	2,15	(0,4 a 11,8)	0,3649
1134	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,2998
1201	4 (0,3%)	1 (0,1%)	4,31	(0,5 a 38,6)	0,1544
1301	13 (0,9%)	6 (0,4%)	2,34	(0,9 a 6,2)	0,0768
1302	26 (1,9%)	4 (0,3%)	7,09	(2,5 a 20,4)	<0,0001

1303	3 (0,2%)	1 (0,1%)	3,23	(0,3 a 31,1)	0,2832
1401	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,07	(0,07 ; 17,2)	0,9595
1404	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,2998
1501	4 (0,3%)	12 (0,8%)	0,36	(0,1 a 1,1)	0,0625
1502	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,07	(0,07 a 17,2)	0,9595
1503	4 (0,3%)	5 (0,3%)	0,86	(0,2 a 3,2)	0,8211
1601	2 (0,1%)	1 (0,1%)	2,15	(0,2 a 23,7)	0,5220
1602	1 (0,1%)	2 (0,1%)	0,54	(0,05 a 5,9)	0,6060
1613	0 (0,0%)	2 (0,1%)	—	—	0,1723

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança.

Suplemento 5 – Distribuição dos alelos HLA-DQB1 nos pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles normais

Alelos	DM1A	Controles	OR	IC95%	<i>p no- estructured</i>
201	423 (30,8%)	156 (11,2%)	3,52	(2,88 a 4,31)	<0,0001
202	94 (6,9%)	136 (9,8%)	0,68	(0,51 a 0,89)	0,0051
203	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
301	140 (10,2%)	189 (13,6%)	0,72	(0,57 a 0,91)	0,0057
302	371 (27,0%)	139 (10,0%)	3,33	(2,69 a 4,12)	<0,0001
303	27 (2,0%)	32 (2,3%)	0,85	(0,51 a 1,43)	0,5399
304	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,3144
307	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,01	(0,06 a 16,19)	0,9935
319	1 (0,1%)	11 (0,8%)	0,09	(0,01 a 0,71)	0,0041
401	5 (0,4%)	6 (0,4%)	0,84	(0,26 a 2,77)	0,7773
402	32 (2,3%)	81 (5,8%)	0,38	(0,25 a 0,58)	<0,0001
501	134 (9,8%)	190 (13,7%)	0,68	(0,54 a 0,86)	0,0014
502	30 (2,2%)	51 (3,7%)	0,59	(0,37 a 0,93)	0,0206
503	7 (0,5%)	40 (2,9%)	0,17	(0,08 a 0,39)	<0,0001
601	6 (0,4%)	8 (0,6%)	0,76	(0,26 a 2,19)	0,6071
602	30 (2,2%)	201 (14,5%)	0,13	(0,09 a 0,19)	<0,0001
603	16 (1,2%)	90 (6,5%)	0,17	(0,09 a 0,29)	<0,0001
604	47 (3,4%)	39 (2,8%)	1,23	(0,79 a 1,89)	0,3518
605	2 (0,1%)	3 (0,2%)	0,67	(0,11 a 4,04)	0,6638
609	4 (0,3%)	12 (0,9%)	0,33	(0,11 a 1,04)	0,0474
611	0 (0,0%)	2 (0,1%)	—	—	0,1596
627	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	<0,0001
Total	1372	1388			

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança.

Suplemento 6 – Distribuição dos genótipos HLA-DRB1/DRB1 nos pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles normais

Genótipos	DM1A	Controles	OR	IC95%	P
1 - 1	3 (0,4%)	5 (0,7%)	0,64	(0,15 a 2,70)	0,5434
1 - 3	29 (4,2%)	18 (2,4%)	1,76	(0,97 a 3,20)	0,0597
1 - 4	52 (7,4%)	19 (2,5%)	3,09	(1,81 a 5,29)	<0,0001
1 - 7	8 (1,1%)	23 (3,1%)	0,37	(0,16 a 0,82)	0,0116
1 - 8	3 (0,4%)	11 (1,5%)	0,29	(0,08 a 1,04)	0,0439
1 - 9	6 (0,9%)	2 (0,3%)	3,24	(0,65 a 16,12)	0,1283
1 - 10	0 (0,0%)	5 (0,7%)	—	—	0,0307
1 - 11	1 (0,1%)	18 (2,4%)	0,06	(0,01 a 0,44)	0,0002
1 - 12	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,07	(0,07 a 17,21)	0,9594
1 - 13	8 (1,1%)	22 (2,9%)	0,38	(0,17 a 0,87)	0,0170
1 - 14	1 (0,1%)	4 (0,5%)	0,27	(0,03 a 2,40)	0,2061
1 - 15	3 (0,4%)	16 (2,1%)	0,19	(0,06 a 0,68)	0,0044
1 - 16	1 (0,1%)	9 (1,2%)	0,12	(0,01 a 0,93)	0,0153
3 - 3	61 (8,7%)	8 (1,1%)	8,88	(4,22 a 18,70)	<0,0001
3 - 4	167 (23,9%)	14 (1,9%)	16,53	(9,48 a 28,85)	<0,0001
3 - 7	19 (2,7%)	21 (2,8%)	0,97	(0,52 a 1,82)	0,9280
3 - 8	10 (1,4%)	8 (1,1%)	1,35	(0,53 a 3,44)	0,5299
3 - 9	18 (2,6%)	4 (0,5%)	4,94	(1,66 a 14,66)	0,0015
3 - 10	4 (0,6%)	3 (0,4%)	1,43	(0,32 a 6,43)	0,6352
3 - 11	8 (1,1%)	17 (2,3%)	0,50	(0,21 a 1,17)	0,1019
3 - 12	2 (0,3%)	4 (0,5%)	0,54	(0,09 a 2,93)	0,4651
3 - 13	20 (2,9%)	17 (2,3%)	1,27	(0,66 a 2,45)	0,4707
3 - 14	2 (0,3%)	6 (0,8%)	0,36	(0,07 a 1,77)	0,1878
3 - 15	8 (1,1%)	19 (2,5%)	0,45	(0,19 a 1,03)	0,0512
3 - 16	8 (1,1%)	7 (0,9%)	1,23	(0,44 a 3,41)	0,6894
4 - 4	42 (6,0%)	10 (1,3%)	4,74	(2,36 a 9,52)	<0,0001
4 - 7	19 (2,7%)	24 (3,2%)	0,85	(0,46 a 1,56)	0,5924
4 - 8	19 (2,7%)	5 (0,7%)	4,17	(1,55 a 11,23)	0,0022
4 - 9	12 (1,7%)	5 (0,7%)	2,61	(0,91 a 7,44)	0,0632
4 - 10	1 (0,1%)	4 (0,5%)	0,27	(0,03 a 2,40)	0,2061
4 - 11	29 (4,2%)	17 (2,3%)	1,87	(1,02 a 3,43)	0,0407
4 - 12	6 (0,9%)	2 (0,3%)	3,24	(0,65 a 16,12)	0,1283
4 - 13	36 (5,2%)	28 (3,7%)	1,40	(0,85 a 2,32)	0,1876
4 - 14	6 (0,9%)	8 (1,1%)	0,80	(0,28 a 2,33)	0,6874
4 - 15	6 (0,9%)	23 (3,1%)	0,27	(0,11 a 0,68)	0,0027
4 - 16	7 (1,0%)	7 (0,9%)	1,07	(0,37 a 3,08)	0,8925
7 - 7	3 (0,4%)	10 (1,3%)	0,32	(0,09 a 1,16)	0,0686
7 - 8	9 (1,3%)	11 (1,5%)	0,88	(0,36 a 2,13)	0,7727
7 - 9	1 (0,1%)	3 (0,4%)	0,36	(0,04 a 3,44)	0,3523
7 - 10	2 (0,3%)	2 (0,3%)	1,07	(0,15 a 7,65)	0,9426
7 - 11	2 (0,3%)	15 (2,0%)	0,14	(0,03 a 0,62)	0,0025
7 - 12	2 (0,3%)	4 (0,5%)	0,54	(0,09 a 2,93)	0,4651
7 - 13	8 (1,1%)	13 (1,7%)	0,66	(0,27 a 1,59)	0,3503
7 - 14	2 (0,3%)	10 (1,3%)	0,21	(0,05 a 0,97)	0,0281
7 - 15	0 (0,0%)	25 (3,3%)	—	—	<0,0001
7 - 16	1 (0,1%)	6 (0,8%)	0,18	(0,02 a 1,48)	0,0718
8 - 8	0 (0,0%)	3 (0,4%)	—	—	0,0944
8 - 9	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3345
8 - 10	1 (0,1%)	2 (0,3%)	0,54	(0,05 a 5,93)	0,6058
8 - 11	1 (0,1%)	9 (1,2%)	0,12	(0,01 a 0,93)	0,0153
8 - 12	1 (0,1%)	2 (0,3%)	0,54	(0,05 a 5,93)	0,6058
8 - 13	2 (0,3%)	9 (1,2%)	0,24	(0,05 a 1,09)	0,0455
8 - 14	0 (0,0%)	7 (0,9%)	—	—	0,0105
8 - 15	0 (0,0%)	11 (1,5%)	—	—	0,0013

8 - 16	1 (0,1%)	3 (0,4%)	0,36	(0,04 a 3,44)	0,3523
9 - 9	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,2998
9 - 10	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,07	(0,07 a 17,21)	0,9594
9 - 11	2 (0,3%)	2 (0,3%)	1,07	(0,15 a 7,65)	0,9426
9 - 12	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,2998
9 - 13	6 (0,9%)	1 (0,1%)	6,49	(0,78 a 54,08)	0,0465
9 - 14	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,2998
9 - 15	0 (0,0%)	2 (0,3%)	—	—	0,1722
9 - 16	1 (0,1%)	0 (0,0%)	—	—	0,2998
10 - 10	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3345
10 - 11	1 (0,1%)	4 (0,5%)	0,27	(0,03 a 2,40)	0,2061
10 - 12	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3345
10 - 13	0 (0,0%)	5 (0,7%)	—	—	0,0307
10 - 15	0 (0,0%)	2 (0,3%)	—	—	0,1722
10 - 16	0 (0,0%)	2 (0,3%)	—	—	0,1722
11 - 11	2 (0,3%)	9 (1,2%)	0,24	(0,05 a 1,09)	0,0455
11 - 12	0 (0,0%)	2 (0,3%)	—	—	0,1722
11 - 13	2 (0,3%)	29 (3,9%)	0,07	(0,02 a 0,30)	<0,0001
11 - 14	0 (0,0%)	5 (0,7%)	—	—	0,0307
11 - 15	2 (0,3%)	16 (2,1%)	0,13	(0,03 a 0,57)	0,0015
11 - 16	1 (0,1%)	7 (0,9%)	0,15	(0,02 a 1,24)	0,0427
12 - 12	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3345
12 - 13	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3345
12 - 14	0 (0,0%)	2 (0,3%)	—	—	0,1722
12 - 15	0 (0,0%)	2 (0,3%)	—	—	0,1722
12 - 16	0 (0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3345
13 - 13	3 (0,4%)	15 (2,0%)	0,21	(0,06 a 0,73)	0,0070
13 - 14	0 (0,0%)	16 (2,1%)	—	—	0,0001
13 - 15	2 (0,3%)	28 (3,7%)	0,07	(0,02 a 0,31)	<0,0001
13 - 16	3 (0,4%)	8 (1,1%)	0,40	(0,12 a 1,51)	0,1631
14 - 14	0 (0,0%)	2 (0,3%)	—	—	0,1722
14 - 15	2 (0,3%)	8 (1,1%)	0,27	(0,06 a 1,26)	0,0733
15 - 15	2 (0,3%)	8 (1,1%)	0,27	(0,06 a 1,26)	0,0733

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança.

Suplemento 7 – Distribuição dos genótipos HLA-DRB1/DRB1 dos pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles

Genótipos	DM1A	Controles	OR	IC95%	P
1 - 1	3 (0,2%)	5 (0,3%)	0,64	(0,15 a 2,70)	0,5434
1 - 3	29 (4,2%)	18 (2,4%)	1,76	(0,97 a 3,20)	0,0597
1 - 4	52 (7,4%)	19 (2,5%)	3,09	(1,81 a 5,29)	<0,0001
1 - 7	8 (1,1%)	23 (3,1%)	0,37	(0,16 a 0,82)	0,0116
1 - 8	3 (0,4%)	11 (1,5%)	0,29	(0,08 a 1,04)	0,0439
1 - 9	6 (0,9%)	2 (0,3%)	3,24	(0,65 a 16,12)	0,1283
1 - 11	1 (0,1%)	18 (2,4%)	0,06	(0,01 a 0,44)	0,0002
1 - 13	8 (1,1%)	22 (2,9%)	0,38	(0,17 a 0,87)	0,0170
1 - 15	3 (0,4%)	16 (2,1%)	0,19	(0,06 a 0,68)	0,0044
1 - 16	1 (0,1%)	9 (1,2%)	0,12	(0,01 a 0,93)	0,0153
3 - 3	61 (8,7%)	8 (1,1%)	8,88	(4,22 a 18,70)	<0,0001
3 - 4	167 (23,9%)	14 (1,9%)	16,53	(9,48 a 28,85)	<0,0001
3 - 7	19 (2,7%)	21 (2,8%)	0,97	(0,52 a 1,82)	0,9280
3 - 8	10 (1,4%)	8 (1,1%)	1,35	(0,53 a 3,44)	0,5299
3 - 9	18 (2,6%)	4 (0,5%)	4,94	(1,66 a 14,66)	0,0015
3 - 10	4 (0,4%)	3 (0,4%)	1,43	(0,32 a 6,44)	0,717
3 - 11	8 (1,1%)	17 (2,3%)	0,50	(0,21 a 1,17)	0,1019
3 - 13	20 (2,9%)	17 (2,3%)	1,27	(0,66 a 2,45)	0,4707
3 - 14	2 (0,3%)	6 (0,8%)	0,36	(0,07 a 1,77)	0,290
3 - 15	8 (1,1%)	19 (2,5%)	0,45	(0,19 a 1,03)	0,0512
3 - 16	8 (1,1%)	7 (0,9%)	1,23	(0,44 a 3,41)	0,6894
4 - 4	42 (6,0%)	10 (1,3%)	4,74	(2,36 a 9,52)	<0,0001
4 - 7	19 (2,7%)	24 (3,2%)	0,85	(0,46 a 1,56)	0,5924
4 - 8	19 (2,7%)	5 (0,7%)	4,17	(1,55 a 11,23)	0,0022
4 - 9	12 (1,7%)	5 (0,7%)	2,61	(0,91 a 7,44)	0,0632
4 - 11	29 (4,2%)	17 (2,3%)	1,87	(1,02 a 3,43)	0,0407
4 - 13	36 (5,2%)	28 (3,7%)	1,40	(0,85 a 2,32)	0,1876
4 - 14	6 (0,9%)	8 (1,1%)	0,80	(0,28 a 2,33)	0,6874
4 - 15	6 (0,9%)	23 (3,1%)	0,27	(0,11 a 0,68)	0,0027
4 - 16	7 (1,0%)	7 (0,9%)	1,07	(0,37 a 3,08)	0,8925
7 - 7	3 (0,4%)	10 (1,3%)	0,32	(0,09 a 1,16)	0,0686
7 - 8	9 (1,3%)	11 (1,5%)	0,88	(0,36 a 2,13)	0,7727
7 - 11	2 (0,3%)	15 (2,0%)	0,14	(0,03 a 0,62)	0,0025
7 - 13	8 (1,1%)	13 (1,7%)	0,66	(0,27 a 1,59)	0,3503
7 - 14	2 (0,3%)	10 (1,3%)	0,21	(0,05 a 0,97)	0,0281
7 - 15	0 (0,0%)	25 (3,3%)	—	—	<0,0001
7 - 16	1 (0,1%)	6 (0,8%)	0,18	(0,02 a 1,48)	0,0718
8 - 13	2 (0,3%)	9 (1,2%)	0,24	(0,05 a 1,09)	0,066
8 - 11	1 (0,1%)	9 (1,2%)	0,12	(0,01 a 0,93)	0,0153
8 - 14	0 (0,0%)	7 (0,9%)	—	—	0,0105
8 - 15	0 (0,0%)	11 (1,5%)	—	—	0,0013
9 - 13	6 (0,9%)	1 (0,1%)	6,49	(0,78 a 54,08)	0,066
11 - 11	2 (0,3%)	9 (1,2%)	0,24	(0,05 a 1,09)	0,0455
11 - 13	2 (0,3%)	29 (3,9%)	0,07	(0,02 a 0,30)	<0,0001
11 - 15	2 (0,3%)	16 (2,1%)	0,13	(0,03 a 0,57)	0,0015
11 - 16	1 (0,1%)	7 (0,9%)	0,15	(0,02 a 1,24)	0,071
13 - 13	3 (0,4%)	15 (2,0%)	0,21	(0,06 a 0,73)	0,0070
13 - 14	0 (0,0%)	16 (2,1%)	—	—	0,0001
13 - 15	2 (0,3%)	28 (3,7%)	0,07	(0,02 a 0,31)	<0,0001
13 - 16	3 (0,4%)	8 (1,1%)	0,40	(0,11 a 1,51)	0,1631
14 - 15	2 (0,3%)	8 (1,1%)	0,27	(0,06 a 1,25)	0,0733
15 - 15	2 (0,3%)	8 (1,1%)	0,27	(0,06 a 1,25)	0,0733
15 - 16	1 (0,1%)	9 (1,2%)	0,12	(0,01 a 0,93)	0,0153
Outros	29 (4,1%)	76 (10,1%)	—	—	—

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança.

Suplemento 8– Distribuição dos haplótipos *HLA-DRB1/DQB1* dos pacientes portadores de diabetes tipo 1 A e controles normais

Haplótipos	DM1A	Controles	OR	IC95%	<i>p no-structured</i>
01 - 0501	114 (8,3%)	142 (10,2%)	0,79	(0,61 a 1,03)	0,0819
01 - 0502	2 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,1548
01 - 0602	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
03 - 0201	4 (0,3%)	(0,0%)	—	—	0,0441
0301 - 0201	389 (28,4%)	109 (7,9%)	4,64	(3,69 a 5,83)	<0,0001
0301 - 0202	7 (0,5%)	4 (0,3%)	1,77	(0,52 a 6,07)	0,3546
0301 - 0302	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
0301 - 0402	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
0301 - 0503	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0302 - 0201	1 (0,1%)	3 (0,2%)	0,34	(0,03 a 3,24)	0,3226
0302 - 0203	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0302 - 0402	(0,0%)	17 (1,2%)	—	—	<0,0001
0303 - 0201	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,01	(0,06 a 16,19)	0,9935
0305 - 0402	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0307 - 0201	6 (0,4%)	2 (0,1%)	3,04	(0,61 a 15,11)	0,1519
0309 - 0201	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
04 - 0201	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
04 - 0202	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
04 - 0302	11 (0,8%)	4 (0,3%)	2,79	(0,89 a 8,80)	0,0665
0401 - 0202	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,01	(0,06 a 16,19)	0,9935
0401 - 0301	18 (1,3%)	7 (0,5%)	2,62	(1,09 a 6,29)	0,0251
0401 - 0302	105 (7,7%)	40 (2,9%)	2,79	(1,92 a 4,05)	<0,0001
0401 - 0304	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
0401 - 0307	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0401 - 0602	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0402 - 0301	11 (0,8%)	2 (0,1%)	5,60	(1,24 a 25,32)	0,0116
0402 - 0302	87 (6,3%)	23 (1,7%)	4,02	(2,52 a 6,40)	<0,0001
0403 - 0301	3 (0,2%)	3 (0,2%)	1,01	(0,20 a 5,02)	0,9887
0403 - 0302	4 (0,3%)	8 (0,6%)	0,50	(0,15 a 1,68)	0,2555
0404 - 0202	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0404 - 0301	6 (0,4%)	1 (0,1%)	6,09	(0,73 a 50,67)	0,0564
0404 - 0302	32 (2,3%)	16 (1,2%)	2,05	(1,12 a 3,75)	0,0178
0404 - 0402	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0405 - 0201	2 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,1548
0405 - 0202	4 (0,3%)	(0,0%)	—	—	0,0441
0405 - 0301	8 (0,06%)	(0,0%)	—	—	0,0127
0405 - 0302	126 (9,9%)	17 (1,2%)	8,15	(4,89 a 13,6)	<0,0001
0405 - 0401	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
0405 - 0402	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
0406 - 0302	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0406 - 0402	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,01	(0,06 a 16,19)	0,9935
0407 - 0301	(0,0%)	5 (0,4%)	—	—	0,0261
0407 - 0302	3 (0,2%)	2 (0,1%)	1,52	(0,25 a 9,10)	0,6451
0408 - 0301	2 (0,1%)	3 (0,2%)	0,67	(0,11 a 4,04)	0,6638
0408 - 0302	2 (0,1%)	3 (0,2%)	0,67	(0,11 a 4,04)	0,6638
0409 - 0301	2 (0,1%)	1 (0,1%)	2,02	(0,18 a 22,36)	0,5567
0410 - 0302	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0410 - 0402	(0,0%)	2 (0,1%)	—	—	0,1596
0411 - 0302	3 (0,2%)	8 (0,6%)	0,38	(0,10 a 1,43)	0,1359
0414 - 0302	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0419 - 0302	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,01	(0,06 a 16,19)	0,9935
0423 - 0302	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
0428 - 0302	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0442 - 0302	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
0449 - 0301	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200

Haplótipos	DM1A	Controles	OR	IC95%	<i>p no-structured</i>
07 - 0201	16 (1,2%)	38 (2,7%)	0,42	(0,23 a 0,75)	0,0029
07 - 0202	55 (4,0%)	109 (7,9%)	0,49	(0,35 a 0,68)	<0,0001
07 - 0301	2 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,1548
07 - 0302	(0,0%)	3 (0,2%)	—	—	0,0849
07 - 0303	2 (0,1%)	7 (0,5%)	0,29	(0,06 a 1,39)	0,0985
07 - 0402	(0,0%)	2 (0,1%)	—	—	0,1596
07 - 0503	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
07 - 0602	(0,0%)	2 (0,1%)	—	—	0,1596
08 - 0301	3 (0,2%)	12 (0,9%)	0,25	(0,07 a 0,89)	0,0210
08 - 0302	5 (0,4%)	(0,0%)	—	—	0,0244
08 - 0303	2 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,1548
08 - 0319	(0,0%)	4 (0,3%)	—	—	0,0466
08 - 0401	3 (0,2%)	6 (0,4%)	0,50	(0,13 a 2,02)	0,3250
08 - 0402	29 (2,1%)	58 (4,2%)	0,49	(0,31 a 0,78)	0,0019
08 - 0501	2 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,1548
08 - 0602	1 (0,1%)	1 (0,1%)	1,01	(0,06 a 16,19)	0,9935
09 - 0201	3 (0,2%)	(0,0%)	—	—	0,0813
09 - 0202	25 (1,8%)	6 (0,4%)	4,27	(1,75 a 10,45)	0,0005
09 - 0301	2 (0,1%)	3 (0,2%)	0,67	(0,11 a 4,04)	0,6638
09 - 0302	4 (0,3%)	4 (0,3%)	1,01	(0,25 a 4,05)	0,9869
09 - 0303	17 (1,2%)	7 (0,5%)	2,47	(1,02 a 5,99)	0,0376
10 - 0501	10 (0,7%)	32 (2,3%)	0,31	(0,15 a 0,63)	0,0007
11 - 0201	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
11 - 0202	(0,0%)	9 (0,6%)	—	—	0,0028
11 - 0301	44 (3,2%)	92 (6,6%)	0,47	(0,32 a 0,67)	<0,0001
11 - 0302	1 (0,1%)	4 (0,3%)	0,25	(0,03 a 2,26)	0,1835
11 - 0303	3 (0,2%)	(0,0%)	—	—	0,0813
11 - 0319	1 (0,1%)	7 (0,5%)	0,14	(0,02 a 1,17)	0,0350
11 - 0501	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
11 - 0502	1 (0,1%)	2 (0,1%)	0,50	(0,05 a 5,58)	0,5703
11 - 0602	(0,0%)	27 (1,9%)	—	—	<0,0001
11 - 0603	(0,0%)	2 (0,1%)	—	—	0,1596
11 - 0604	2 (0,1%)	1 (0,1%)	2,02	(0,18 a 22,36)	0,5567
11 - 0611	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
12 - 0301	12 (0,9%)	19 (1,4%)	0,64	(0,31 a 1,31)	0,2180
12 - 0303	(0,0%)	2 (0,1%)	—	—	0,1596
12 - 0501	1 (0,1%)	3 (0,2%)	0,34	(0,03 a 3,24)	0,3226
13 - 0201	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
13 - 0202	(0,0%)	5 (0,4%)	—	—	0,0261
13 - 0301	6 (0,4%)	16 (1,2%)	0,38	(0,15 a 0,96)	0,0346
13 - 0303	3 (0,2%)	16 (1,2%)	0,19	(0,05 a 0,65)	0,0030
13 - 0307	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
13 - 0402	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
13 - 0501	1 (0,1%)	4 (0,3%)	0,25	(0,03 a 2,26)	0,1835
13 - 0602	13 (0,9%)	15 (1,1%)	0,88	(0,41 a 1,85)	0,7270
13 - 0603	17 (1,2%)	86 (6,2%)	0,19	(0,11 a 0,32)	<0,0001
13 - 0604	46 (3,4%)	38 (2,7%)	1,23	(0,79 a 1,91)	0,3470
13 - 0605	2 (0,1%)	2 (0,1%)	1,01	(0,14 a 7,19)	0,9907
13 - 0609	3 (0,2%)	12 (0,9%)	0,25	(0,07 a 0,89)	0,0210
13 - 0611	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
14 - 0201	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
14 - 0301	1 (0,1%)	9 (0,6%)	0,11	(0,01 a 0,88)	0,0119
14 - 0302	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
14 - 0501	3 (0,2%)	9 (0,6%)	0,34	(0,09 a 1,24)	0,0862
14 - 0502	2 (0,1%)	2 (0,1%)	1,01	(0,14 a 7,19)	0,9907
14 - 0503	7 (0,5%)	38 (2,7%)	0,18	(0,08 a 0,41)	<0,0001
14 - 0602	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200

Haplótipos	DM1A	Controles	OR	IC95%	<i>p no-structured</i>
14 - 0605	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
15 - 0202	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
15 - 0302	2 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,1548
15 - 0501	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
15 - 0502	2 (0,1%)	3 (0,2%)	0,67	(0,11 a 4,04)	0,6638
15 - 0601	4 (0,3%)	7 (0,5%)	0,58	(0,17 a 1,97)	0,3750
15 - 0601	1 (0,1%)	(0,0%)	—	—	0,3144
15 - 0602	17 (1,2%)	152 (11,0%)	0,10	(0,06 a 0,17)	<0,0001
15 - 0603	(0,0%)	3 (0,2%)	—	—	0,0849
16 - 0301	3 (0,2%)	14 (1,0%)	0,21	(0,06 a 0,75)	0,0080
16 - 0501	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
16 - 0502	25 (1,8%)	42 (3,0%)	0,59	(0,36 a 0,98)	0,0399
16 - 0602	(0,0%)	1 (0,1%)	—	—	0,3200
Total	1372	1388			

DM1A= diabetes mellitus tipo 1 auto-imune, n= número de indivíduos, OR= odds ratio, IC= intervalo de confiança.

10. Referências Bibliográficas

1. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:177-82.
2. Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, *et al*. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *Plos One*. 2011;6(2):e17063.
3. Silva MER, Mory Denise, Davini E. Marcadores genéticos e autoimunes do diabetes melito Tipo 1: da teoria para a prática. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52:166-180.
4. Karvonen M, Viik-Kajander Maarit, Moltchanova E, Libman I, Laporte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 Diabetes Worldwide. *Diabetes Care*. 2000;23:1516-26.
5. Karlsen AE, Dyrberg, T. Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity. *Semin Immunol*. 1998;10(1):25-34.
6. Eisenbarth GS, Lafferty K. *Type 1 diabetes: cellular, molecular and clinical immunology. Chapter 7. Type 1 Diabetes Mellitus of Man: Genetic Susceptibility and Resistance*. Available from: <http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/books.html>.
7. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe, CS, Lemmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S52-61.
8. Alves LI, Davini E, Correia MR, Fukui RT, Santos RF, Cunha MR, *et al*. Autoantibodies and high-risk HLA susceptibility markers in first-degree relatives of Brazilian patients with type 1 diabetes mellitus: a progression to disease based study. *J Clin Immunol*. 2012;32(4):778-85.
9. Park Y. Functional evaluation of the type 1 diabetes (T1D) susceptibility candidate genes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77 Suppl 1:S1 110-5.
10. Wetterbom A, Sevov M, Cavelier L, Bergström TF. Comparative genomic analysis of human and chimpanzee indicates a key role for indels in primate evolution. *J Mol Evol*. 2006;63(5):682-90.
11. Van Rood JJ. The impact of HLA-system in clinical medicine. *Shweiz Med Wschr*. 1993;123(3):85-92.
12. Meyer D, Thomson G. How selection shapes variation of the human major histocompatibility complex: a review. *Ann. Hum. Genet*. 2001;65:1-26.

13. Ichinose K, Tahara-Hanaoka S, Kawasaki E, Eguchi K. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potencial relevance to diabetic nephropaty. *Am J Nephrology*. 2007;27(6):554-64.
14. Juan-Manuel A, Rojas-Villarraga A, Botello-Corzo D. HLA-Class II in Latin American pacientes with type 1 diabetes. *Autoimmun Rev*. 2010;9(10):666-73.
15. Zhang Q, Tang S, Peng W, Wang C, Tang H, Zhang Q. Association of the PTPN22 gene (+1858C/T, -1223G/C) polymorphisms with type 1 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012;97(3):446-52.
16. Lira R, Cavalcanti N. *Diabetes mellitus*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Diagraphic; 2006; 6-7:71-86.
17. Steck AK, Pugliese GS, Eisenbarth. Type 1 diabetes mellitus of man: genetic susceptibility and resistance. *Adv Exp Med Biol*. 2004;552:170-203.
18. Mainardi-Novo DTO, Santos AS, Silva MER, Gamberini M, Correia MR, Ruiz MO, *et al*. The PTPN22 1858T allele but not variants in the proximal promoter region of IL-21 gene is associated with the susceptibility to type 1 diabetes and the presence of autoantibodies in a Brazilian cohort. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(1):16-22.
19. Kittles RA, Weiss KM. Race, ancestry and genes: implications for defining disease risk. *Ann Rev Genomics Hum Genet*. 2003;4:33-67.
20. Tishkoff AS, Kidd KK. Implications of biogeography of human populations for *race* and medicine. *Nature Genet*. 2004;36:S21-7.
21. Patrinos A. *Race and the human genome*. *Nat Genet*. 2004;36:1-2.
22. Waters MC. *Ethnic options: choosing identities in America*. Berkeley. University of California press.
23. Parra EJ, Kittles RA, Shriver MD. Implications of correlations between skin color and genetic ancestry for biomedical research. *Nat Genet*. 2004;36:S54-60.
24. Shriver MD, Parra EJ, Dios S, Bonilla C, Norton H, Jovel C, *et al*. Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixturing mapping. *Hum Genet*. 2003;112:387-99.
25. Jahromi MM, Eisenbarth GS. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(7-8):865-72.

26. Dean M, Sthephens JC, Winckler C, Lomb DA, Ramsburg M, Boaze R, *et al.* Polymorphic admixture typing in human ethnic populations. *Am J Hum Genet.* 1994;55:788-808.
27. Pfaff CL, Parra EJ, Bonilla C, Hiester K, McKeigue PM, Kamboh MI, *et al.* Population structure in admixed populations: effect of admixture dynamics on the pattern of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet.* 2001;68(1):198-207.
28. Yushi L, Toru N, Shuguang L. Softwares and methods for estimating genetic ancestry in human populations. *Human Genomics.* 2013;7:1.
29. Nassir R, Kosoy R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, *et al.* An ancestry informative marker set for determining continental origin: validation and extension using human genome diversity panels. *BMC Genet.* 2009;10:39.
30. Halder L, Shriver M, Thomas M, Fernandez JR, Frudakis T. A panel of ancestry informative markers for estimating individual biogeographical ancestry and admixture from four continents: utility and applications. *Hum Mutat.* 2008;29(5):648-58.
31. Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(10):870-6.
32. Santos, NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 2010;31(2):184-90.
33. Tian C, Kosoy R, Nassir R, Lee A, Villoslada P, Klareskog L, *et al.* European population genetic substructure: further definition of ancestry informative markers for distinguishing among diverse European ethnic groups. *Mol Med.* 2009;15(11-12):371-83.
34. Barbujani G, Magagni A. *et al.* An apportionment of human DNA diversity. 1997. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:4516-9.
35. Romualdi C, Balding D, *et al.* Patterns of human diversity, within and among continents, inferred from biallelic DNA polymorphisms. *Genome Res.* 2002;12(4):602-12.
36. Rosenberg NA, Pritchard JK. *et al.* Genetic structure of human populations. *Science.* 2002;298:2381-5.
37. Excoffier L, Hamilton G. Comment on "Genetic structure of human populations". *Science.* 2003;300(5627):1877; author reply 1877.

38. Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR. The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann Hum Genet.* 2006;70:658-65.
39. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2004;409(6822):860-921.
40. Venter JC, Adams MD. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;5507:1304-51.
41. Tapper W, Collins A, Gibson J, Maniatis N, Ennis S, Morton NE. A map of the human genome in linkage disequilibrium units. *Proceed Nat Acad Sci.* 2005;102(33):11835-9.
42. Khaja R, Zhang J, MacDonald JR, He Y, Joseph-George AM, Wei J, *et al.* Genome assembly comparison identifies structural variants in the human genome. *Nat Genet.* 2006;38(12):1413-8.
43. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature.* 2006;444(7118):444-54.
44. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, *et al.* A second generation human haplotype map of over 3,1 million SNPs. *Nature.* 2007;449(7164):851-61.
45. Kaiser J. DNA sequencing: A plan to capture human diversity in 1000 genomes. *Science.* 2008;319(5862):395.
46. Gamazon ER, Zhang W, Dolan ME, Cox NJ. Comprehensive survey of SNPs in the Affymetrix exon array using the 1000 Genomes dataset. *Plos One.* 2010;5(2):e9366.
47. Excoffier L, Heckel G. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nat Rev Genet.* 2006;7(10):745-58.
48. Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2006;38(8):904-9.
49. Pritchard JK, Stephens M. *et al.* Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet.* 2000;1:170-81.
50. Patterson N, Hattangadi N, Lane B, Lohmueller KE, Hafler DA, Oksenberg JR, *et al.* Methods for high-density admixture mapping of disease genes. *Am J Hum Genet.* 2004;74(5):979-1000.

51. Sankararaman S, Sridhar S, Kimmel G, Halperin E. Estimating local ancestry in admixed populations. *Am J Hum Genet.* 2008;8(2):290-303.
52. Price AL, Tandon A. *et al.* Sensitive detection of chromosomal segments of distinct ancestry in admixed populations. *Plos Genet.* 2009;6:e1000519.
53. Schlesinger D. *A Ancestralidade da população de São Paulo e correlação com alterações neuropatológicas no idoso* [Tese]. Instituto de Biociências, área Biologia e Genética. 2010. 160p.
54. Schlesinger D1, Grinberg LT, Alba JG, Naslavsky MS, Licinio L, Farfel JM, Suemoto CK, de Lucena Ferretti RE, Leite RE, de Andrade MP, dos Santos AC, Brentani H, Pasqualucci CA, Nitrini R, Jacob-Filho W, Zatz M. African ancestry protects against Alzheimer's disease-related neuropathology. *Mol Psychiatry.* 2013 Jan;18(1):79-85.
55. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2010;39(3): 481 97.
56. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 ;16(3):1215.
57. The Luminex 200TM User's Manual, Luminex Corporation, PN 89-00002-00-005 Rev. B. [cited 2014 may 01]. Available from: www.biometrix.com.br.
58. Bennett ST, Wilson AJ, Esposito L, Bouzekri N, Undlien DE, Cucca F, *et al.* Insulin VNTR allele-specific effect in type 1 diabetes depends on identity of untransmitted paternal allele. *Nat Genet.* 1997;17(3):350-2.
59. Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, *et al.* CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol.* 1997;82(1):143-6.
60. International HapMap Project. [cited 2014 may 01]. Available from: hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.yo.
61. Foundation Jean Dausset. HGDP-CEPH Human Genome Diversity Cell Line Panel [cited 2014 may 01]. Available from: www.cephb.fr/en/hgdp/diversity.php/%E2%80%8E.
62. Britten RJ, Rowen L, Williams J, Cameron RA. Majority of divergence between closely related DNA samples is due to indels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;100(8):4661-5.

63. Golden Gate Genotyping Assay for VeraCode Manual Protocols. Illumina, Inc. 2010. Catalog # VC 901-1001. Rev B [cited 2014 may 01]. Available from: <http://www.illumina.com>.
64. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, Diabetes Care. 2003 Jan;26 Suppl 1:S5-20.
65. Bussab WO, Morettin PA. *Estatística básica*. 4ª ed. São Paulo: Atual Editora; 1987. 321p.
66. Conover WJ. *Practical nonparametric statistics*. New York: John Wiley & Sons; 1980.
67. Neter J, Wasserman W, Kutner MH. *Applied linear statistical models*. 3ª ed. Homewood, Illinois: Irwin; 1990. 127p.
68. Winer BJ. *Statistical principles in experimental designs*. 2ª ed. New York: McGraw-Hill; 1971. 907p.
69. Falush D, Stephens M, Pritchard JK. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 2003;164(4):1567-87.
70. Falush D, Stephens M, Jonathan K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol Notes*. 2007;7(4): 574-578.
71. Mattana TCC, Santos SA, Fukui RT, Silva MER. CD 226 rs763361 is associated with the susceptibility to Type 1 Diabetes and greater frequency of GAD65 autoantibody in a Brazilian cohort. *Mediators of Inflammation* (in press).
72. Diabetes Care. 2000. Epidemiology - Diabetes Care. 2000;23:1516–26.
73. Hauache OM, Reis AF, Oliveira CS, Vieira JG, Sjoroos M, Ilonen J. Estimation of diabetes risk in Brazilian population by typing for polymorphisms in HLA-D-DQ, INS and CTLA-4 genes. *Dis Markers* 2005;21(3):139-45.
74. Undlien DE, Hamaguchi K, Kimura A, Tuomilehto-Wolf E, Swai AB, McLarty DG, Tuomilehto J. *et al*. IDDM susceptibility associated with polymorphisms in the insulin gene region. A study of blacks, Caucasians and orientals. *Diabetologia*. 1994;37(8):745-9.
75. Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet*. 2005;50:264-6.

-
76. Ikegami H, Kawabata Y, Noso S, Fujisawa T, Ogihara T. Genetics of type 1 diabetes in Asian and Caucasian populations. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77 (Suppl. 1):S116-21.
77. Alves C, Souza T, Veiga S, Alves CO, Toralles MB, Lemaire D. A importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. *Pediatria (São Paulo)* 2005;27(4):24-86.
78. Alves C, Fortuna MMC, Toralles MB. A aplicação e o conceito de raça em saúde pública: definições, controvérsias e sugestões para uniformizar sua utilização nas pesquisas biomédicas e na prática clínica. *Gazeta Medica da Bahia* 2005;75(1):92-115.
79. Volpini WMG, Testa GV, Marques SBD, Alves LI, Silva MER, Dib SA, et al. Family-based association of HLA class II alleles and haplotypes with type I diabetes in Brazilians reveals some characteristics of a highly diversified population. *Hum Immunol* 2001;62(11):1226-33.
80. Alves C, Meyer I, Vieira N, Toralles M B P, LeMaire Denise. Distribuição e Frequência de Alelos e Haplótipos HLA em Brasileiros com Diabetes Melito Tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006;50(3):436-444.
81. Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol.* 2003;56(1):1-10.
82. Reveille JD. The genetic basis of autoantibody production. *Autoimmun Rev.* 2006;5(6):389-98.
83. Brito LA. Identificação de Genes de Suscetibilidade às Fissuras Labiopalatinas Não Sindrômicas: Influência da Epidemiologia e da Estratificação Populacional. [dissertação]. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2011.
84. Concannon P, Rich SS, Nepom GT, Genetics of Type 1A Diabetes. *N Engl J Med* 2009; 360(16):1646-1654.
85. Standards of medical care in diabetes - 2015. *Diabetes Care.* 2015;38(Suppl 1):S3.

-
86. Bomfim, T.F. Análise de ancestralidade genômica e de polimorfismos associados a pigmentação da pele em ameríndios e em descendentes de africanos, de europeus e de japoneses. [tese]. Salvador – BA. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz; 2012.
 87. Thomson G, Valdes AM, Noble JA, Kockum I, Grote MN, Najman J, et al. Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. *Tissue Antigens*.2007;70(2):110 – 127.
 88. Redondo MJ, Fain PR, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res*. 2001; 56: 69-89.
 89. Noble JA, Johnson J, Lane JA, Valdes AM. HLA Class II Genotyping of African American Type 1 Diabetic Patients Reveals Associations Unique to African Haplotypes. *Diabetes*.2013;62(9):3292-3299.
 90. Howson JM¹, Roy MS, Zeitels L, Stevens H, Todd JA. HLA class II gene association in African American Type 1 diabetes reveal a protective HLA-DRB1*03 haplotype. *Diabet. Med*.2013;30(6):710 – 716.
 91. Gomes MB, Negrato CA, Cobas R, Tannus LR, Gonçalves PR, da Silva PC, et al. Determinants of intensive insulin therapeutic regimens in patients with type 1 diabetes: data from a nationwide multicenter survey in Brazil. *Diabetology & Metabolic Syndrome*.2014;6:67.
 92. Allele, haplotype nd genotype frequencies in worldwide population. The Allele Frequency Net Database. Avaliable from: www.allelefrequencies.net. Last consultation in February, 2016.
 93. Fabreti-Oliveira RA, Nascimento E, Fonseca CG, Santos MA. The heterogeneous HLA genetic composition of the Brazilian population and its relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens*.2014;84(2):187–97.