TERESA CRISTINA COLVARA MATTANA

Variantes do gene *CD226* associadas com a susceptibilidade ao
diabetes mellitus tipo 1 autoimune

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

(Versão corrigida. Resolução Co PGr 5890, de 20 de Dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Mattana, Teresa Cristina Colvara

Variantes do gene CD226 associadas com a susceptibilidade ao diabetes
mellitus tipo 1 autoimune / Teresa Cristina Colvara Mattana. -- São Paulo, 2012.

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.Gene CD226 3.Sistema imunológico
4.Técnicas de genotipagem 5.Autoanticorpos

USP/FM/DBD-167/12

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

Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) 2008/04472-6.

Dedicatória

Aos pacientes com DM1A, sempre persistentes em seus caminhos, com os quais tenho aprendido muito.

Agradecimentos

Agradeço à força maior que sempre está ao nosso lado, Deus!

Agradeço à minha família por todo apoio, incentivo e compreensão. Em especial agradeço aos meus pais, sem os quais não sei se teria chegado até aqui! Obrigada, amo muito vocês!

Agradeço à minha orientadora, Dra. Beth por esta oportunidade e ensinamentos.

Agradeço a toda equipe do LIM 18: Aritânia, Rosinha, Greci, Fátima (riqueza), Maria do Carmo, Maria José, Adriana, Márcia, Dra. Rosa, Bruno, Maysa, Dra. Dalva, Maria Edna, Mari, Rodolfo e demais (desculpem se esqueci alguém), não só pela imensa ajuda, mas pela amizade, dedicação e companheirismo. Vocês foram uma segunda família durante todo este período!

Aritânia (Tânia), muito obrigada pela ajuda sem medidas para que este trabalho pudesse ser realizado, nem sempre as coisas foram fáceis, mas você nunca recuou e sempre ficou do meu lado, obrigada mesmo! Obrigada Rosinha não só pela ajuda, mas por toda palavra de carinho em momentos cruciais!

Gostaria de agradecer ainda a dois colegas muito especiais que eu nunca esquecerei Vinícius e Kátia (Dra. Kátia). Agradeço ainda as minhas amigas Luciana e Tatiana que sempre estavam por perto, ao Pedro por sempre acreditar que eu conseguiria e não me deixar desanimar e a Ida por tentar me entender e aguentar todas as minhas lamentações!

Emília, sei que você está longe, mas muito obrigada!

Agradeço por fim aos pacientes, aos quais dedico esta tese e espero ajudar! Obrigada!

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de tabelas

Lista de Anexo

Resumo

Summary

1- Introdução	1
2- Revisão de Literatura	3
2.1.Diabetes Mellitus tipo 1 Autoimune	3
2.2.DM1A e Genética	6
2.2.1.Sistema HLA	6
2.2.2. VNTR e PTPN22	8
2.3.Genome Wide Association Studies	9
2.4.DM1A e Resposta Imune	10
2.5.Autoimunidade e DM1A	12
2.6.Marcadores de Superfície Linfocitária e Moléculas de Adesão	14
2.7.CD226 (DNAM-1)	15
2.7.1.CD226 e Autoimunidade	18
3- Justificativa do Estudo	21
4- Objetivos	22
5- Materiais e Métodos	23
5.1. Considerações Éticas	23
5.2. Casuística	23
5.3. Avaliação Bioquímica	24
5.3.1.Glicemia	24
5.3.2. Hemoglobina Glicada	24
5.3.3. Peptídeo C	24
5.3.4. Auto-anticorpos pancreáticos(anti-GAD e anti-IA2)	25
5.3.5. Auto Anticorpos Extrapancreáticos	26
5.3.5.1. Anti-21 OH	26

5.3.5.2. Anti-CP e Anti-AML	26
5.3.5.3. Anti- TPO e Anti-TG	26
5.3.5.4. TRAB	26
5.3.5.5. FAN	27
5.3.5.6. Fator reumatóide (FR)	27
5.3.3.7. Anti-LKM-1	27
5.3.5.8. Anti-endomísio	27
5.3.5.9. ANCA	27
5.4. Estudo Molecular	28
5.4.1. Genotipagem do Sistema HLA (-DR)	28
5.4.2. Amplificação do gene <i>CD226</i>	29
5.4.2.1. PCR	29
5.4.2.2. Sequenciamento automático	31
5.4.2.3. Genotipagem de SNP	32
6- Análise Estatística	34
7- Resultados	35
7.1. Estratégia do Estudo	35
7.2. Caracterização da População Estudada	35
7.3. Alelos do Sistema HLA –DR	39
7.4. Gene <i>CD226</i>	40
7.4.1. PCR e sequenciamento	40
7.4.2. Genotipagem	43
7.4.2.1. Genotipagem (rs1788101- rs763361-rs727088)	43
7.4.2.2. Características DM1A rs763361	45
7.4.2.3. Características DM1A rs727088	49
7.4.2.4. Análise rs763361 e rs727088 por gênero	53
7.4.3. Desequilíbrio de Ligação	54
7.5. Análise de Haplótipos (Frequência estimada)	54
7.5.1. Haplótipos rs763361 e rs727088	57
7.6. Análise de Regressão Logística	61
8- Discussão	62
9- Conclusão	69
10- Anexo	70
Referências Bibliográficas	71

Lista de Abreviaturas

A	adenina
AML	anti-músculo liso
ANCA	anti-citoplasma de neutrófilo
<i>Annealing</i>	pareamento
Anti-21OH	anti-21 Hidroxilase
Anti-CP	anti-célula parietal
Anti-endom	anti-endomísio
Anti-LKM1	anti-microssomal de fígado e rim
Anti-TG	anti-tireoglobulina
Anti-TPO	anti-tireoperoxidase
α L β 2	integrina de adesão celular – também chamada LFA1
APCs	células apresentadoras de antígenos
C	citossina
CD226/DNAM-1	molécula de adesão leucocitária
DM1A	diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 autoimune
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DP	desvio padrão
EDTA	ácido diaminoetanotetracético
FAN	fator anti-núcleo
Fas	receptor de indução da apoptose
FR	fator reumatóide
G	guanina
GAD65	enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65
H ₂ O MilliQ [®]	água ultrapura
HbA1c	hemoglobina glicada
HLA	antígeno leucocitário humano.
HLA- DR3/DR4	antígeno leucocitário humano(alelo específico)
HPLC/ CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
IA2	tirosina fosfatase
IAA	anticorpo antiinsulina
IC	intervalo de confiança
ICA	antiilhotas de Langerhans citoplasmático
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
IDDM-1	<i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus-1 (locus)</i>
IDDM-2	<i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 2 (locus)</i>
IFN	interferon
IL	interleucina
Ig	imunoglobulina
INS	insulina
LFA-1	antígeno associado a função leucocitária-1
LES	lúpus eritematoso sistêmico
LYP	proteína linfóide tirosina fosfatase
LPS	lipopolissacarídeo
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
NK	células exterminadoras “ <i>natural killer</i> ”
NOD	linhagem de camundongo não obeso diabético

OR	razão de chances, do inglês “ <i>odds ratio</i> ”
Pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
<i>Primer F</i>	iniciadores sense (Forward)
<i>Primer R</i>	iniciadores antisense (Reverse)
PTA-1	ativador do antígeno 1 de plaquetas e células T
PTPN-22	não-receptor da proteína tirosina fosfatase tipo 22
PVR	receptor de poliovírus
PRR	receptores relacionados ao poliovírus
RNA	ácido ribonucleico
RR	risco relativo
T	timina
T CD4 ⁺	linfócitos T CD4 ⁺
T CD8 ⁺	linfócitos T citotóxicos
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> enzima polimerase
TCR	receptor de células T
TGFβ	fator transformador de crescimento β
Th	T helper
TNF	fator de necrose tumoral
TRAB	anti-receptor do TSH
TLiSA	linhagem específica de células T- ativadora de antígenos
Treg	células T reguladoras
UTR	região não traduzida
UV	ultra-violeta
VCAM-1	molécula de adesão celular - vascular -1
VLA-4	integrina alfa 4
VNTR	<i>variable number tandem repeats</i>
Znt8	transportador de zinco 8

Lista de Símbolos

α	alfa
β	beta
γ	gama
=	igual
>	maior
<	menor
$\leq$	menor igual
$\pm$	mais ou menos
%	percentagem
N	número
dL	decilitro
μ L	microlitro
mL	mililitro
ng	nanograma
mg	miligrama
U	Unidade
nU	Nanounidade
M	Molar
mM	Milimol
pMol	Picomol
MgCl ₂	cloreto de magnésio
Na	Sódio
I ¹²⁵	iodo 125
KDa	Kilodaltons
°C	grau Celsius

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Funções do CD226: participação do processo de citotoxicidade, sinalização, adesão celular e sinalização intracelular.....18
- Figura 2.** Foto do Gel de Agarose a 2%, demonstrando o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase do gene CD226.....30
- Figura 3.** Resultado segundo emissão de fluorescência analisada por genotipagem (*TaqMan*).....33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Iniciadores utilizados na reação de PCR e sequenciamento das regiões codificadoras e flanqueadoras do gene CD226.....	29
Tabela 2.	Características Clínicas de pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles.....	36
Tabela 3.	Características laboratoriais de pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles.....	37
Tabela 4.	Distribuição dos autoanticorpos extra pancreáticos em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles.....	38
Tabela 5.	Frequência dos alelos HLA-DR em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles.....	39
Tabela 6.	Frequência dos genótipos HLA -DR mais prevalentes em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles.....	40
Tabela 7.	Frequência alélica e genotípica das variantes intrônicas do CD226 identificadas pela PCR e sequenciamento em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles.....	42
Tabela 8.	Frequência alélica e genotípica das variantes exônicas do CD226 identificadas pela PCR e sequenciamento em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles.....	43
Tabela 9.	Frequência alélica e genotípica das variantes rs1788101, rs763361 e rs727088 do CD226 em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles.....	44
Tabela 10.	Frequência dos genótipos e alelos da variante rs763361 do CD226 segundo as características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de diabetes tipo 1A.....	46
Tabela 11.	Frequência dos Genótipos do polimorfismo rs763361 do CD226 em portadores de DM1A com até 2 anos de duração do diabetes e valores séricos de anticorpos anti-GAD, anti-IA2 e de peptídeo C.....	47
Tabela 12.	Frequência dos autoanticorpos extra pancreáticos segundo a variante rs763361 do CD226 em pacientes com DM1A.....	48
Tabela 13.	Frequência dos genótipos e dos alelos da variante rs727088 do CD226 segundo características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de diabetes tipo 1A.....	50
Tabela 14.	Frequência dos Genótipos do polimorfismo rs727088 do CD226 em portadores de DM1A com até 2 anos de duração do diabetes e valores séricos de anticorpos anti-GAD, anti-IA2 e de peptídeo C.....	51
Tabela 15.	Frequência dos autoanticorpos extra pancreáticos segundo a variante rs727088 do CD226 nos pacientes diabéticos.....	52

Tabela 16.	Frequência alélica e genotípica da variante rs763361 do <i>CD226</i> em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles estratificados pelo sexo.....	53
Tabela 17.	Frequência alélica e genotípica da variante rs727088 do <i>CD226</i> em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles estratificados pelo sexo.....	54
Tabela 18.	Identificação, distribuição e frequência dos haplótipos estimados entre os grupos de diabéticos tipo 1A e controles.....	55
Tabela 19.	Distribuição dos haplótipos entre os grupos de pacientes DM1A e controles caucasoídes.....	56
Tabela 20.	Distribuição dos haplótipos entre os grupos de pacientes DM1A e controles não caucasoídes.....	56
Tabela 21.	Frequência do genótipo do haplótipo ACAC das variantes rs763361 e rs727088 <i>CD226</i> em pacientes diabéticos tipo 1A e controles.....	57
Tabela 22.	Frequência do genótipo do haplótipo ACAC das variantes rs763361 e rs727088 do <i>CD226</i> e características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de diabetes tipo 1A.....	58
Tabela 23.	Frequência do genótipo do haplótipo ACAC dos polimorfismos rs763361 e rs727088 do <i>CD226</i> em portadores de DM1A com até 2 anos de duração do diabetes e valores séricos de anticorpos anti-GAD, anti-IA2 e de peptídeo C.....	59
Tabela 24.	Frequência dos autoanticorpos extra pancreáticos segundo o genótipo do haplótipos ACAC do <i>CD226</i> nos pacientes diabéticos.....	60
Tabela 25.	Fatores associados ao diabetes tipo 1A em uma análise bivariada através da Análise de Regressão Logística Simples.....	61

LISTA DE ANEXO

ANEXO1:	Aprovação da Comissão de Ética CAPPesq.....	70
----------------	---	----

RESUMO

MATTANA, T. C. **Variantes do gene *CD226* associadas com a susceptibilidade ao diabetes mellitus tipo 1 autoimune.** Tese [doutorado]- São Paulo, "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

Recentemente, estudos de *Genome Wide Association* (GWA) identificaram uma nova região cromossômica, 18q22, como de susceptibilidade ao Diabetes tipo 1 autoimune (DM1A). Nesta região localiza-se o gene *CD226*, responsável por codificar uma molécula de adesão leucocitária (*CD226*) envolvida no processo de adesão celular, diferenciação de células T *CD4+* virgens, citotoxicidade induzida por células *natural killer* (NK) e produção de citocinas. Até o momento, apenas o polimorfismo rs763361 A/G foi relacionado ao diabetes autoimune e pouco é conhecido quanto ao envolvimento de outras variantes do *CD226*, associadas a outras doenças autoimunes, na patogênese do DM1A. Com o objetivo de definir as variantes polimórficas relacionadas à susceptibilidade ao DM1A, às suas características fenotípicas e outras manifestações de autoimunidade, 532 pacientes diabéticos tipo 1A e 594 controles normais foram envolvidos neste estudo. Inicialmente, em um subgrupo de 106 diabéticos e 102 controles, as regiões codificadoras e flanqueadoras do gene *CD226*, obtidas do DNA genômico de leucócitos do sangue periférico, foram amplificadas pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase e submetidas à sequenciamento direto. Em uma segunda etapa, os polimorfismos rs763361, rs1788101 e rs727088 foram genotipados pelo

ensaio *TaqMan* nos demais pacientes e controles. Resultados: foram identificadas 12 variantes no gene *CD226*, sete com frequência acima de 5%. Nenhuma variante nova foi encontrada. A variante rs727088 não estava em equilíbrio de Hardy Weinberg no grupo controle. Os genótipos AA da variante rs763361 e CC do rs727088 foram associados ao risco de DM1A e estavam em desequilíbrio de ligação. O genótipo do haplótipo ACAC, formado pelas variantes de risco, predominou nos pacientes diabéticos. Tanto o genótipo AA do rs763361 como o CC do rs727088 e o genótipo do haplótipo ACAC foram associados com menores valores de peptídeo C em pacientes com até dois anos de duração da doença. Nenhum polimorfismo influenciou na presença de autoanticorpos pancreáticos e extra-pancreáticos. Conclusão: O genótipo AA da variante rs763361 do gene *CD226* predispõe ao diabetes autoimune na nossa população, assim como a menores valores de Peptídeo C, contribuindo para a maior agressividade da doença. Dados da variante rs727088 devem ser analisados com cautela devido à falta de equilíbrio de Hardy Weinberg no grupo dos controles.

Descritores: 1.diabetes mellitus tipo1 2.gene *CD226* 3.sistema imunológico
4 .técnicas de genotipagem 5.autoanticorpos

Summary

MATTANA, T.C.C. **CD226 gene variants associated with susceptibility to type 1, immune mediated, diabetes.** [thesis]-São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Recently, Genome Wide Association (GWA) studies identified a new locus, 18q22, as a candidate to Type 1 A, or immune mediated diabetes (T1_AD) susceptibility. This locus harbors the *CD226* gene, responsible for encoding the leukocyte adhesion molecule (CD226) involved in cell adhesion, differentiation of naïve CD4⁺T cells, cytotoxicity induced by natural killer (NK) cells and cytokine production. Although just one single nucleotide polymorphism (SNP) rs763361 A/G had been related to T1_AD, little is known about the involvement of new variants of *CD226*, implicated in other autoimmune disorders, in the pathogenesis of T1_AD. In order to identify polymorphic variants related to T1_AD susceptibility and their influences in phenotypic characteristics and other manifestations of autoimmunity, 532 type 1A diabetic patients and 594 health controls were enrolled in this study. Initially, in a subset of 106 diabetics and 102 controls, coding and flanking regions of *CD226* gene obtained from genomic DNA extraction were amplified by polymerase chain reaction technique and subjected to direct sequencing. In a second step, the polymorphisms rs763361, rs727088 and rs1788101 were genotyped by *TaqMan* assay in the remaining patients and controls. Results: 12 variants in *CD226* gene, seven of them with frequency above 5 % where identified. We did not found new variants. The variant rs727088 was not in Hardy Weinberg equilibrium in the control group. The genotypes AA (OR=1.45; p=0.005) and CC (OR=1.41; p=0.01) related to rs763361 and rs727088 variants respectively, were

associated with risk of T1_AD. Both predominated in female ($p < 0.01$). Further, these variants were in linkage disequilibrium. The genotype haplotype ACAC formed by the risk variants was more frequent in patients with diabetes (30.5% x 25.6%; OR=1.42; $p=0.014$). The AA genotype of rs763361, the CC genotype and ACAC genotype haplotype were associated with lower levels of C-peptide in patients with no more than two years of disease course. The presence of pancreatic and extra-pancreatic autoantibodies was not associated with *CD226* SNPs. Conclusion: The AA genotype of rs763361 variant of the gene *CD226* predisposes to autoimmune diabetes in our population, as well as to lower levels of C-peptide, contributing to the aggressiveness of the disease. It predominated in female. Data of rs727088 variant should be analyzed with caution due to the lack of Hardy Weinberg equilibrium in the control group.

Descriptors: 1. type 1 diabetes, 2. *CD226* gene, 3. immune system 4. genotyping techniques 5. autoantibodies.

1- INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus tipo 1A (DM1A) é uma doença autoimune órgão específica, caracterizada pela destruição progressiva das células beta (β) do pâncreas. Sua etiologia é parcialmente conhecida, tendo influência de fatores ambientais e genéticos. Anormalidades imunológicas humorais e celulares participam deste processo, as quais precedem as manifestações clínicas da doença. Apesar da maioria dos mecanismos de destruição das células β permanecerem desconhecidos, muitas moléculas estão envolvidas, incluindo citocinas e quimiocinas¹⁻⁵.

Durante a última década, com o aprimoramento dos estudos genéticos, muitos *loci* de susceptibilidade (IDDM) foram relacionados ao diabetes com evidências de interações epistáticas, sugerindo que o DM1A é uma doença poligênica com fatores contribuindo tanto para susceptibilidade quanto para a resistência à doença³.

A ativação de células T do sistema imune desencadeia em indivíduos geneticamente susceptíveis a infiltração linfocitária nas ilhotas pancreáticas (insulinite), assim como a ativação da resposta humoral (células B), com produção de anticorpos contra um ou mais autoantígenos das células β pancreáticas. A evolução para diabetes clínico é desencadeada pelo desenvolvimento fenotípico mais agressivo de células T, resultando no desequilíbrio entre as vias de ativação de linfócitos T helper (Th1/Th2) e células T regulatórias^{2,4}.

Estudos de rastreamento amplo do genoma (*Genoma Wide Association*) obtiveram evidências do envolvimento da região cromossômica 18q22 no desenvolvimento do DM1 autoimune. Nessa região há vários genes e entre eles, o responsável por codificar a molécula de superfície linfocitária CD226⁶.

A molécula de adesão linfocitária CD226 ou DNAM-1 (molécula 1 acessória DNAX) está expressa constitutivamente na maioria dos linfócitos T, células *natural killer* (NK), monócitos e plaquetas, tendo um papel importante no sinal coestimulatório para a diferenciação e proliferação de

células T *naive* (não estimuladas)^{7,8}. Em células T CD4+ diferenciadas, sua expressão está aumentada no subgrupo Th1 e diminuída, no Th2⁹. Participa ainda do processo de citotoxicidade induzida por células natural killer (NK) e produção de citocinas^{8,10,11}.

Considerando que vias relacionadas com a imunidade adaptativa (Th1) e inata (NK) estão implicadas no processo de destruição das células β pancreáticas, o estudo do gene *CD226*, envolvido na diferenciação de células T CD4+ e citotoxicidade, parece fundamental para estabelecer seu papel como gene de susceptibilidade. Alguns estudos demonstraram associação do polimorfismo rs763361, localizado no exon 7 do gene *CD226* com susceptibilidade ao DM1A e outras doenças autoimunes^{10,12,13}.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus tipo 1 Autoimune

O Diabetes Mellitus Tipo 1 compreende 5 a 10% de todos os casos de diabetes. Pode ser dividido em dois tipos: 1A (mais de 80% dos casos), de origem autoimune, e 1B (10% a 20%), de etiologia desconhecida, caracterizado pela insulinopenia transitória, baixa susceptibilidade à cetose e ausência de sinais de autoimunidade. O tipo 1A é uma doença progressiva, caracterizada pela destruição seletiva das células β do pâncreas, evoluindo com absoluta deficiência de insulina^{1,14}.

Dentre as doenças crônicas da infância é a que apresenta maior variação geográfica em sua incidência sofrendo, nos últimos anos, um acréscimo de 2% a 5% no número de novos casos. As maiores incidências de DM1A são observadas na Finlândia (36,5/100.000) e Sardenha (36,8/100.000) e as menores na China e América do Sul (<1,0/100.000)¹. No Brasil, apesar da escassez de dados, identificam-se incidências de 7,6/100.000 (São Paulo-SP)¹⁵ até 12/100.000 (Passo Fundo-RS)¹⁶. Apesar de apresentar distribuição semelhante entre meninas e meninos observa-se, em populações com altas incidências, o predomínio do sexo masculino e, nas regiões de baixa incidência, o excesso de acometimento no sexo feminino^{17,18}. Geralmente ocorre na faixa etária da infância e adolescência com pico entre 10 e 14 anos, mas pode acometer indivíduos de qualquer idade, incluindo oitava e nona décadas¹⁴.

A etiologia do diabetes tipo 1A é parcialmente conhecida, reconhecendo-se a interação de fatores ambientais e genéticos. Em 2005, Gianini e Eisenbarth sugeriram que o DM1 ocorreria em seis estágios. O primeiro estágio denotaria a predisposição genética seguida pela presença de gatilhos ambientais, anormalidades humorais e celulares, um período de latência, presença de manifestações clínicas e, finalizando, insulino-dependência¹⁹.

Alterações nos sistemas imunológicos, humoral e celular, participam do processo de destruição de células β e precedem as manifestações clínicas da doença, à semelhança da maioria das doenças autoimunes. Muitas moléculas mediadoras da inflamação, incluindo citocinas e quimocinas, estão envolvidas neste processo. A velocidade de destruição das células β é bastante variável, sendo rápida em alguns indivíduos (principalmente crianças) e lenta em outros (principalmente adultos). Nos estágios avançados da doença, a ausência ou pouca secreção de insulina é representada por níveis baixos ou indetectáveis do peptídeo C. Originados da clivagem da pró-insulina em insulina, os níveis de peptídeo C espelham a função remanescente das células β ^{5,20}.

O melhor critério para o diagnóstico de DM1A é a presença de autoanticorpos de alta especificidade contra antígenos das células β ²¹. Entre o crescente número de autoanticorpos, o anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65 (GAD65), o anti-fragmento intracelular da molécula homóloga à proteína da família tirosina fosfatase (anti-IA2, ICA512), o anti insulina (IAA), o anti transportador de zinco 8 (Znt8), recentemente descrito, e os anti antígenos citoplasmáticos não específicos encontrados nas ilhotas de Langerhans (ICA), são importantes para o diagnóstico e predição da doença^{22,23}. Tipicamente, esses anticorpos estão presentes anos antes do desenvolvimento do DM1A e, ao contrario do que se imaginava não são apenas marcadores, mas sua presença parece aumentar a resposta das células T aos autoantígenos²⁴. Quanto maior o número de autoanticorpos, maior o risco e velocidade de evolução para o diabetes²⁵. A detecção de apenas um único anticorpo evidência o processo imune, mas raramente, a progressão para a doença. Geralmente a susceptibilidade para autoimunidade tem características de agregação familiar. O risco de diabetes também pode variar de acordo com o anticorpo presente, sendo maior na presença de anti-IA2/IA2 β ^{22,26}. Pacientes com DM1A e seus familiares são mais susceptíveis ao desenvolvimento de outras doenças autoimunes como a doença tireoideana (15% a 30%) autoimune, a doença

celíaca (4 a 9%), a doença de Addison (0,5%) e a anemia perniciosa, entre outras^{27,28}.

Apesar do DM1A ocorrer em indivíduos geneticamente susceptíveis, a sazonalidade, a variação temporal e a ausência de sinais de autoimunidade em familiares indicam que o componente genético sozinho não é o único responsável pela expressão da doença, presumindo-se que fatores ambientais contribuam para o seu desenvolvimento. Entre os agentes etiológicos mais citados como possíveis desencadeantes estão as infecções pelo vírus coxsackie e da rubéola, as toxinas (pesticidas e nitratos), a deficiência na suplementação de vitamina D e de ácido graxo omega-3, a introdução precoce do leite de vaca e a introdução abrupta de cereais^{29,30,31}. Dentre as teorias, prevalece a hipótese da higiene, na qual o aumento na incidência do DM1A é atribuída à baixa frequência de infecções na infância³². No entanto, os dados sobre os fatores ambientais relacionados com o desenvolvimento de diabetes, têm, até o momento, pouca consistência³⁰.

Hoje sabe-se que o DM1A compreende um grupo heterogêneo de doenças com muitos determinantes genéticos, sendo o principal, as moléculas de classe II do sistema HLA (antígeno leucocitário humano). Durante a última década, com o aprimoramento dos estudos genéticos, muitos *loci* de susceptibilidade (IDDM) foram relacionados ao diabetes, contribuindo tanto para susceptibilidade quanto para a resistência à doença^{1,2,28}.

Assim, são necessárias múltiplas estratégias de rastreamento, em diferentes populações, de genes e de fatores ambientais aos quais elas estão expostas. Até recentemente, estudos de associação em DM1A buscaram genes, vias e regiões cromossômicas sugestivos de predisporerem à doença, mas devido à incerteza quanto ao número e a ação dos mesmos, os novos estudos de genética têm abordagens mais abrangentes e menos específicas quanto aos mecanismos de risco subjacentes. A identificação de variantes alélicas de risco pelos estudos de *Genome Wide Association*, seguida pelo entendimento dos seus mecanismos funcionais, ampliará o

número de novos genes candidados, revolucionando o conhecimento nesta área^{33,31}.

2.2 DM1A e Genética

Um importante fator de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 1A é a presença de um familiar de primeiro grau afetado. Crianças com um membro da família acometido apresentam risco de 5% de manifestar a doença, superior ao da população geral (0,3%). A concordância entre gêmeos monozigóticos chega a 50% e entre irmãos, o risco pode chegar a 7%. A chance de desenvolver a doença aumenta quando mais de um familiar de primeiro grau é acometido^{22,34,35}.

Estudos de associação e *Linkage* a partir da década de 90 foram utilizados para identificar *loci* de susceptibilidade genética ao diabetes tipo 1A (IDDM). Nesta ocasião duas regiões foram associadas à doença: o *locus* do MHC (Complexo principal de histocompatibilidade) ou HLA e o polimorfismo da região *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR) do gene da insulina, juntos contribuindo com 42% a 50% do risco genético. Através de estudos de genes candidatos outros *loci* de susceptibilidade foram identificados, entre eles o PTPN22. Até o momento mais de 40 *loci* foram descritos e implicados no DM1A. O rastreamento recente do genoma humano sugere que muitos deles apresentavam resultados falsos positivos, efeito genético mínimo ou eram restritos a uma população específica, não apresentando função na predição da doença^{2,28}.

2.2.1 Sistema HLA

O principal *locus* implicado na susceptibilidade ao DM1A está localizado no complexo do HLA, no braço curto do cromossomo 6 (6p21), em particular, nas moléculas do HLA classe II (DR, DQ e DP)³. A função do HLA é apresentar antígenos ao linfócito T. Heterodímeros da cadeia alfa (α)

e beta (β) codificadas pelos genes HLA-DQA1 e -DQB1 exercem papel importante na predisposição ao diabetes. Esses dois genes são extremamente polimórficos no segundo exon, apresentando múltiplos alelos. O polimorfismo da cadeia DQ β , posição 57, parece ser um forte determinante para DM1. A ausência de aspartato na posição 57 da cadeia DQ β e a presença de arginina na posição 52 da cadeia DQ α , são fatores de susceptibilidade, com efeito aditivo^{36,37}. Nos caucasianos, os alelos DQA1*0301, DQB1*0302, DQA1*0501 e DQB1*0201, são os mais associados ao risco da doença^{2,3,21}.

Os alelos DQ estão em desequilíbrio de ligação com os HLA-DR, ou seja, são herdados conjuntamente e não são associados aleatoriamente. Os alelos –DR*03 ou DR*04 são os mais freqüentes nos pacientes diabéticos (95% versus 50% dos controles caucasianos). O genótipo HLA-DR*03/DR*04 confere o maior risco para a doença seguido pela homozigose para –DR*04 e DR*03. Devido ao desequilíbrio de ligação, as associações com o diabetes são melhores definidas pelos haplótipos. O maior risco é conferido pelos haplótipos HLA-DQA1*0501-DQB1*0201 (chamado de DQ2), geralmente herdado com DRB1*0301 (DR3) e o haplótipo –DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8), herdado com DRB1*0401 ou DRB1*0405 (DR4). Na população geral estes haplótipos de risco são encontrados em 20-30% dos diabéticos tipo 1A e em aproximadamente 50% dos diagnosticados em idade precoce, na infância^{2,3,22,29,38}. Crianças que apresentam o haplótipo de risco DR3/DR4-DQ8 e um familiar afetado apresentam risco de 25% para o desenvolvimento da doença, podendo chegar a 50% quando mais de 2 familiares forem afetados²¹. Nos pacientes com DM1A do Hospital das Clínicas da FMUSP (São Paulo), Davini e cols observaram predomínio dos haplótipos HLA-DRB1*03/DQB1*0201 (45,2%) e –DRB1+04/DQB1*0302 (52,7%) nos pacientes diabéticos quando comparados com controles (17,8% e 16,3%, respectivamente)^{39,40}. Alves e cols analisaram outros cinco estudos sobre alelos e haplótipos HLA no Brasil, confirmando a maior susceptibilidade para os haplótipos DR3/DQ2 e DR4/DQ8 na nossa população⁴¹.

No *locus* HLA, responsável por codificar as moléculas DQ e DR, localizam-se também os alelos relacionados à proteção ao diabetes. O alelo DQB1*0602 e os haplótipos, DRB1*0401/ DQA1*0101/ DQB1*0503 e DRB1*0701/ DQA1*0201/ DQB1*0303 conferem maior proteção. A falta de alelos protetores frente à presença de alelos de susceptibilidade aumenta o risco de familiares de primeiro grau expressarem auto anticorpos pancreáticos^{2,3,25,42}.

Haplótipos do sistema HLA são úteis para identificar crianças propensas à autoimunidade e ao desenvolvimento de autoanticorpos. Resultados provenientes de estudos como BABYDIAB, DIPP e DAISY mostraram que em crianças com genótipos de risco HLA, os autoanticorpos eram mais frequentes e surgiam precocemente. A genotipagem do complexo do HLA pode ainda ajudar a identificar autoanticorpos relevantes na progressão do diabetes tipo 1A^{22,43,44}.

2.2.2 VNTR (*Variable number tandem repeat*) do Gene da Insulina e *PTPN22* (Gene da proteína tirosina fosfatase, não receptor, tipo 22)

Outros múltiplos *loci* estão implicados na susceptibilidade para o DM1A destacando-se nesse grupo o VNTR do gene da insulina (*INS*) e o polimorfismo C1858T do *PTPN22*²⁸.

O segundo *locus*, em importância, denominado IDDM II, está localizado no cromossomo 11p15. Estima-se que este *locus* contribua com 10% do risco para o diabetes tipo 1A. A região predisponente abriga um número variável de sequências repetidas (VNTR) na região regulatória do *INS*. De acordo com o número de repetições, os alelos do VNTR são divididos em 3 classes. A classe I apresenta o menor número de repetições (26 a 63 unidades) e a classe III, o maior número (141-209 unidades). Homozigotos para a classe I têm risco duas a cinco vezes para desenvolver diabetes, enquanto a classe III confere proteção. O efeito protetor do polimorfismo do *INS* está associado com maior expressão do RNA

mensageiro da proinsulina no timo, sugerindo que níveis aumentados do transcrito neste local promoveria a deleção de células T reagentes à insulina^{2,3,28}.

Já a proteína tirosina fosfatase linfóide (LYP), codificada pelo gene *PTPN22*, é forte inibidora da via de sinalização das células T. O polimorfismo C1858T, localizado na região cromossômica 1p13, responsável pela troca de arginina por triptofano na posição 620 (R620W), foi associada a DM1 em 2004²⁸. O alelo de risco T ocorre em 12% dos diabéticos e em 8% dos indivíduos saudáveis contribuindo, significativamente, para a susceptibilidade à doença em populações caucasianas. Na nossa população Mainardi e cols, observaram predomínio dos genótipos CT/TT em pacientes portadores de DM1A conferindo risco relativo para a doença de 1,94⁴⁵.

2.3 Genome Wide Association Studies

Recentemente, estudos de Rastreamento amplo do genoma foram realizados em DM1A. Um dos estudos mais abrangentes, o Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), empenhado no estudo de doenças complexas, mostrou associação de 6 regiões cromossômicas com DM1A (12q24, 12q13, 16p13, 18p11, 12p13 e 4q27), muitas delas já avaliadas, e obteve evidência para um novo polimorfismo, rs763361, localizado na região 18q22, onde está o gene *CD226*. Este gene é responsável por codificar a molécula de superfície linfocitária CD226, envolvida no processo de ativação linfocitária^{6,10}.

Em julho de 2007 o JDRF (*Juvenile Diabetes Research Foundation International*), instituição destinada ao financiamento de pesquisas em diabetes tipo 1A, destacou a importância do *CD226* (DNAM-1), sugerindo uma possível associação entre sua variabilidade funcional na susceptibilidade e gênese do DM1A⁴⁶.

2.4 DM1A e Resposta Imune

O sistema imunológico humano está subdividido em sistema imune inato, caracterizado por manter-se inalterado mesmo após estímulos repetidos, e sistema adaptativo. Destes dois sistemas fazem parte as células dendríticas, macrófagos, monócitos, fagócitos, linfócitos T (*thymus derived*), responsáveis pela imunidade celular e linfócitos B (*bone-marrow derived*), responsáveis pela imunidade humoral. Linfócitos T constituem 70%-80% dos linfócitos periféricos e apresentam uma subpopulação de células T citotóxicas, capaz de efetuar lise celular. Células *natural killer* (NK) fazem parte do grupo de células T citotóxicas e, juntas com as células dendríticas, são cruciais ao sistema imune inato⁴⁷.

As células T expressam moléculas em sua superfície que servem como alvos para imunofenotipagem celular. A partir desse processo as células podem ser identificadas e protocoladas em *cluster of differentiation* (CD), que agem na maioria dos casos como receptores ou ligantes. Podem exercer ainda função de adesão celular. CD4 e CD8 são moléculas utilizadas como marcadoras para células T *helper* e citotóxicas, respectivamente, e que têm como função aumentar a avidéz da ligação da célula T à célula apresentadora de antígeno (APC) no caso das células CD4, ou à célula alvo, no caso das células CD8, facilitando a ativação dessas células⁴⁸.

Células do sistema imunológico produzem citocinas, proteínas de baixo peso molecular,⁴⁹ que desempenham papel fundamental na diferenciação de células T e na ativação dos diferentes subtipos de linfócitos T. A ativação de subpopulações de células T resulta na secreção de diversas citocinas que irão determinar o perfil da resposta imune. A diferenciação de células T CD4+ em linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1) ocorre na presença de IL-12 e IFN- γ que irão determinar um perfil inflamatório. A diferenciação em linfócitos T *helper* tipo 2 (Th2) ocorre na presença de IL-4 e determina um perfil antiinflamatório. Atualmente, outras subpopulações de

linfócitos T foram descritas de acordo com a sua atividade e padrão de produção de citocinas: linfócitos Th3, caracterizados pela produção de TGF- β , associados a um perfil regulador da resposta imune; linfócitos T CD4+ CD25+ produtores de TGF- β e IL-10, também chamados de células T reguladoras (Treg), devido à sua capacidade de supressão da resposta imune, suprimindo doenças inflamatórias e prevenindo autoimunidade; e células Th17, caracterizadas pela produção de IL-17 e associadas a perfil inflamatório⁵⁰.

No diabetes tipo 1A, a destruição seletiva das células β é sabidamente mediada pela via Th1, envolvendo células T CD8+ e o sistema imune inato⁵¹. O evento que desencadeia o processo inflamatório permanece por ser elucidado.

Estudos em camundongos diabéticos não obesos (NOD) identificaram a participação de diferentes células do sistema imune na destruição das células β . Além das células TCD4+, CD8+ e macrófagos, outros tipos celulares foram encontrados no infiltrado pancreático e nos linfonodos de drenagem, onde ocorre a apresentação inicial dos antígenos da ilhota pelas células dendríticas. Fazem parte das células de reconhecimento específico os linfócitos B, células NK, NKT e um subgrupo de células dendríticas que podem contribuir para a morte das células β ⁵¹.

Em indivíduos geneticamente susceptíveis, a ativação de células T desencadeia a infiltração linfocitária entre as ilhotas pancreáticas (insulite), assim como a ativação da resposta humoral (células B), com produção de anticorpos contra um ou mais autoantígenos celulares. O recrutamento das células T para as ilhotas pancreáticas não é completamente entendido, envolvendo, provavelmente, produção local de quimiocinas por células apresentadoras de antígenos, células endoteliais e pelas próprias células β ^{20,52}.

Sugere-se que a evolução para o diabetes seja desencadeada pelo desenvolvimento fenotípico mais agressivo de células T, com desequilíbrio entre as vias de ativação de linfócito T helper Th1/Th2 e células T regulatórias^{29,47,53}.

2.5 Autoimunidade e DM1A

No DM1A, a autoimunidade é desencadeada precocemente, porém muitos indivíduos com positividade para autoanticorpos pancreáticos não desenvolvem insulite ou diabetes, permanecendo as células T autorreativas sob o controle do sistema imune por anos²⁰. Fatores ambientais, como dieta e infecções virais, estão envolvidos no desencadeamento deste processo, contribuindo com a ativação e expansão de células T autorreativas²⁹.

O processo de seleção dos linfócitos T antígeno específicos inicia-se durante o desenvolvimento tímico. O parâmetro crítico para definir o desfecho está fundamentado na afinidade e no número (densidade) de TCRs (receptores de células T) ligados às moléculas do sistema HLA na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC), ou seja, depende da avidéz de ligação. Os processos de seleção negativa e apoptose dependem ainda da quantidade de antígenos presentes no organismo. Quando um limiar crítico é excedido, o timo deleta células T auto reativas, gerando sinal de morte celular. Quando o limiar de seleção não é atingido, as células T auto reativas escapam da deleção tímica⁴⁷. No DM1A, as moléculas de HLA com alta avidéz por antígenos diabetogênicos ligam-se preferencialmente a esses, expressando natureza dominante⁵⁴.

O processo de tolerância periférica é condicionado à ação das células T regulatórias (Treg), que controlam o desenvolvimento, o tráfego e a proliferação das células T efetoras. Em camundongos NOD, o declínio de uma subpopulação de células Treg específicas para antígenos de ilhotas pancreáticas parece ser um fator crítico para o desenvolvimento de diabetes^{53, 55,56,57}. Estudos demonstram que o grau de apoptose das células Treg está aumentado nos seis primeiros meses do diagnostico de DM1A em humanos, voltando a valores normais após este período. Recentemente, Crisóstomo e cols mostraram diminuição no número de células T regulatórias em pacientes com DM1A de início recente, corroborando com dados da literatura⁵⁸.

A alteração na geração ou na depuração de células apoptóticas pode resultar na produção de autoantígenos, enquanto distúrbios no mecanismo de apoptose podem induzir resistência ao processo normal de morte celular. Anormalidades no Fas, um receptor de superfície celular pertencente à superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral, estão presentes em pouco menos de 30% dos DM1A, atingindo 70% nas formas mais agressivas (relacionadas a outras doenças autoimunes)⁵⁹. A interação Fas-Fas ligante induz uma série de eventos, incluindo ativação da cascata das caspases e alterações mitocondriais, resultando em apoptose celular⁶⁰. Huges e cols demonstraram que a indução limitada da apoptose de células β pancreáticas, antes do início da doença, previne o desenvolvimento de células T auto reativas⁶¹. Estudos experimentais, em que ocorria aumento da morte de células β , resultavam em ativação precoce de células efetoras e aceleração do processo de insulite, sugerindo que a diminuição na depuração de células apoptóticas auxiliaria no desencadeamento da autoimunidade⁵⁴.

As células dendríticas parecem ter papel fundamental no desenvolvimento do diabetes tipo 1A. Isto é consistente com a observação de que a primeira fase de progressão da doença é caracterizada pela infiltração de APCs profissionais nas ilhotas pancreáticas⁶². Células dendríticas imaturas são altamente especializadas em endocitose, enquanto expressam poucas moléculas coestimulatórias e, do complexo HLA. Em estado de repouso, células dendríticas imaturas podem capturar autoantígenos e apresentá-los a células T em órgãos linfóides induzindo tolerância periférica por reduzir a expansão, desencadear a deleção ou anergia de células T específicas⁶³. Vários estudos com camundongos NOD documentaram redução na geração de células dendríticas e defeito das mesmas em interagir com células T alogênicas⁶⁴. Angelini e cols mostraram que, em crianças afetadas pelo DM1A, as células dendríticas apresentavam baixa expressão de moléculas coestimulatórias, necessárias para ativação de células T, alterando a função das mesmas⁶⁵.

Quanto às células NK, numerosos estudos indicam que a depleção destas células relaciona-se com aumento da severidade de doenças autoimunes. Ao regular negativamente a ação de linfócitos T citotóxicos autorreativos, parecem exercer função protetora no desenvolvimento do diabetes tipo 1A⁶⁵.

Apesar das células T com atividade inflamatória serem consideradas as responsáveis pela destruição autoimune das células beta pancreáticas, estudos têm mostrado a participação de linfócitos B neste processo. Sabe-se da importância destas células como apresentadoras de antígeno, auxiliando a ativação de células T. Camundongos NOD com ausência de linfócitos B, apresentaram redução e atraso no processo de insulite⁶⁶. Foi observado ainda ausência de resposta contra GAD65, provavelmente por ser um processo que necessita de células B como APC⁶⁷. A função exata desta célula no diabetes tipo 1 ainda permanece desconhecida.

2.6 Marcadores de Superfície Linfocitária e Moléculas de Adesão

Significante progresso foi feito com a identificação de fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação de células TCD4+. No entanto, existem poucos marcadores de superfície celular que distinguem estes tipos celulares de forma inequívoca. A expressão de alguns receptores de quimiocina e moléculas coestimulatórias difere de acordo com o tipo celular, mas a diferença entre eles é principalmente quantitativa, sendo que esses receptores podem também ser identificados na superfície de células T *naive*, não estimuladas^{10,68}.

Moléculas de adesão celular são fundamentais para o processo inflamatório, assim como para o processo de resposta imune mediada por linfócitos T. Durante o processo inflamatório, a ligação dos leucócitos às células endoteliais é mediada por moléculas de adesão. ICAM-1/LFA-1, CD62E/CD15, CD34/CD62L, CD31/CD31 e VCAM-1/VLA4 são exemplos de moléculas que fazem parte desse grupo. Mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e LPS (Lipopolissacarídeo) participam deste processo ao induzirem a

expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, afetando a adesão, migração e transmigração dos leucócitos^{10,69}.

Na resposta imune, além do reconhecimento do antígeno específico pelo receptor de células T, os linfócitos T citotóxicos requerem o acoplamento de moléculas acessórias aos respectivos ligantes expressos nas células alvo. Moléculas acessórias facilitam o processo de conjugação celular e auxiliam na transdução de sinal durante a indução de citotoxicidade. Aumentam a avides de ligação e consequentemente o tempo de interação celular. Grande variedade de moléculas acessórias expressas nas células T (CD8, CD4, CD28, LFA1 e CD2) está envolvida neste processo, incluindo o CD226⁶⁹.

2.7 CD226 (DNAM-1)

A molécula de adesão CD226 (DNAM-1), com gene localizado no cromossomo 18q22^{6,10,70}, é uma glicoproteína trans-membrana de aproximadamente 65kDa, caracterizada por 2 domínios extracelulares *Ig-like* e uma porção citoplasmática contendo 3 resíduos tirosina. Pertence à superfamília das Imunoglobulinas (Ig), tendo como ligantes o CD112 e CD155. Seu gene é intensamente conservado em humanos, chimpanzés e macacos Rhesus, sugerindo função biológica¹⁰.

Inicialmente foi descrita como uma molécula (ativadora de antígenos) presente em uma linhagem específica de células T (TLiSA), envolvida na diferenciação de linfócitos citotóxicos. Logo após sua função na adesão plaquetária ao endotélio foi identificada, sendo renomeada como ativador do antígeno 1 de plaquetas e células T (PTA1)⁷⁰. Em 1996, Shibuya e col, propuseram a designação DNAM-1 (molécula acessória DNAX-1) baseado no seu estudo, no qual o CD226 foi caracterizado como uma molécula de adesão e ativadora do receptor de linfócito T citotóxicos e células NK¹⁰.

A molécula CD226 está expressa na maioria das células NK, células T, monócitos, plaquetas e em um subgrupo de células B, porém está

ausente em granulócitos e eritrócitos. Também está expressa em uma subpopulação de timócitos CD3 e numa variedade de células hematopoiéticas transformadas¹¹.

O receptor de poliovírus (PVR) alfa (CD155) e a sua isoforma PVR δ foram identificados como ligantes do CD226. CD155 é membro da família dos receptores relacionados ao poliovírus (PRR) que consiste do CD111 (nectina-1/PRR-1), CD112 (nectina-2/PRR-2), nectina-3 (PRR-3) e nectina-4 (PRR-4). Os ectodomínios da família PRR são formados por 3 domínios *Ig like* que compartilham 30-55% de homologia entre os aminoácidos. A partir desta particularidade, tanto o CD111 quanto o CD112 foram testados como ligantes para o CD226 e apenas o CD112 foi identificado com esta ação⁷. O CD155 e o CD112 estão amplamente expressos na maioria dos tipos celulares, incluindo neurônios, células endoteliais e fibroblastos^{11,71}. Após reconhecimento do antígeno pelo TCR, o CD226 associa-se fisicamente com a molécula de adesão antígeno 1 associado à função do leucócito (LFA1), uma α L β 2 integrina (CD11a/CD18) expressa na maioria dos leucócitos, responsável por favorecer a adesão celular. Ativação do LFA-1 em células CD4⁺ medeia sinais coestimulatórios e induz várias respostas celulares, incluindo apoptose, proliferação, produção de citocinas e diferenciação em células Th1^{8,72}. Dados emergentes sugerem ainda que o CD226 age como molécula adaptadora para os sinais coestimuladores iniciados pelo LFA-1. Previamente demonstrou-se que a estimulação do LFA-1/ICAM-1 estava implicada na diferenciação de células Th e que o bloqueio desta via alterava a migração transendotelial de células Th1. O LFA-1 associa-se fisicamente com o CD226 e com a proteína quinase Fyn, colaborando, após esta agregação, com o desenvolvimento de células Th1^{8,68}. Dardalhon, e cols identificaram o CD226 como uma molécula seletivamente expressa em células Th1 diferenciadas, mas não em Th2 ou Th0⁹. Shibuya e cols, demonstraram que a superexpressão de uma mutação negativa na sinalização do domínio CD226 em células CD4⁺ *naïve* suprimia fortemente a diferenciação Th1, confirmando sua importância neste processo⁶⁸.

Na indução de citotoxicidade mediada por células NK, o CD226 participa cooperando com outros ligantes e com os receptores das células NK⁷³. Em células B16F10, de melanoma, a expressão do CD226 permite que células NK eliminem, com maior eficácia, as células tumorais resistentes tendo, provavelmente, um papel importante no mecanismo de vigilância imunológica contra tumores e certas infecções virais, fracamente imunogênicas e refratárias à citotoxicidade mediada por células NK. Células T CD8+ requerem a presença do CD226 para coestimulação após reconhecimento de antígenos apresentados por APCs não especializadas, contribuindo com a resposta imunológica contra células tumorais que expressam CD112 e/ou CD155⁷⁴. Assim, durante a resposta imune, o CD226 atua não só na diferenciação das células T CD4+, mas também na do linfócito T citotóxico em célula efetora, e na ativação de macrófagos para a apresentação eficiente de antígenos¹¹.

Devido à sua ampla expressão em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, expande a ligação de células NK e T às células endoteliais e aos vários tecidos epiteliais durante a resposta imune⁷⁵.

O CD226 também está expresso em plaquetas, sendo identificado a princípio como PTA1, uma glicoproteína de membrana envolvida na ativação e agregação plaquetária. Medeia ainda a ligação entre trombina e células endoteliais humanas. Células endoteliais humanas ativadas podem expressar intensamente o CD226, estando o mesmo envolvido com adesão a determinados tipos celulares. O recrutamento dos linfócitos a sítios de inflamação ocorre em etapas, iniciando com a aproximação às células endoteliais que recobrem os vasos sanguíneos, seguido de rolamento, ativação, adesão e migração. A adesão dos linfócitos circulantes é mediada por diversos receptores de citocinas sendo a combinação desses, responsável pela especificidade de migração nos diversos tecidos. O CD226 também é crucial para a migração transendotelial de macrófagos no processo de diapedese^{10,11,75}. As principais funções do CD226 estão representadas na figura 1.

Figura 1: Funções do CD226: participação do processo de citotoxicidade, sinalização, adesão celular e sinalização intracelular⁴². NK: natural killer; CTL: linfócitos T citotóxicos; PVR: receptor do poliovírus; Nectin2: receptor da família das nectinas; Mφ: macrófago; platelets: plaquetas; Mgc: megacariócitos; TCR: receptor de células T; MHCII: Complexo principal de histocompatibilidade classe II; APC: célula apresentadora de antígeno¹¹.

2.7.1 CD226 e Autoimunidade

A partir de 2007, os estudos de *genome wide association*, identificaram a associação do polimorfismo não sinônimo (Gly306Ser), rs763361, do *CD226* com múltiplas doenças autoimunes. Todd e cols contribuíram com os primeiros resultados quando, após avaliação de 2700 pacientes diabéticos, tipo 1A, e 3500 controles de descendência europeia, detectaram o papel do polimorfismo rs763361 do *CD226* na susceptibilidade ao DM1A⁶. Conhecendo-se previamente a interação de diabetes tipo 1A com

doença tireoideana autoimune, nesse mesmo estudo este polimorfismo foi relacionado com doença de Graves (2200 pacientes estudados). Em 2009, Douroudis e cols confirmaram a associação com diabetes tipo 1A em uma população da Estônia comparando 154 DM1 e 230 controles¹³.

Além do diabetes e doença de Graves, outros estudos o identificaram como variante causal para esclerodermia, esclerose múltipla, artrite reumatóide, doença celíaca, lúpus eritematoso sistêmico, granulomatose de Wegener e psoríase^{12,76}.

Também na esclerose múltipla, na qual o alelo DRB1*1501 é fator de risco, e sabidamente protetor para o DM1, o risco conferido pela presença do polimorfismo rs763361 foi mantido⁷¹.

O polimorfismo ainda confere maior gravidade para a esclerodermia, assim como para alguns aspectos relacionados à psoríase^{77,78}.

Quanto à artrite reumatóide e doença celíaca, além de populações caucasianas, o polimorfismo também foi um fator de risco para as populações asiáticas e sulamericanas, respectivamente¹².

No lúpus eritematoso sistêmico, além do rs763361, outro polimorfismo, rs727088 na região 3'UTR (*untranslated region*), também foi relacionado à susceptibilidade à doença. O haplótipo formado por esses polimorfismos mais o rs34794968, todos localizados no exon 7 do *CD226*, resultou em baixa expressão do transcrito e da proteína na superfície de células T CD4+, CD8+ e NK⁷⁹. Uma melhor investigação identificou o rs727088 como a variante de maior importância na regulação da transcrição do *CD226* em células T e NKT.

No trabalho de Amit e cols, a associação de DM1A com a população colombiana não caucasiana apenas mostrou resultado significativo após a junção com dados relativos a populações caucasianas, sendo escassos dados relacionando DM1A e o rs763361 em populações heterogêneas quanto à etnia⁸⁰.

A consequência funcional da presença de glicina ou serina na posição 307 da proteína, determinada pela variante rs763361, ainda permanece por ser esclarecida. Sugere-se que esta troca de aminoácidos possa alterar o

sítio de *splice* iniciador ou silenciador, alterando assim o *splicing* de RNA, resultando em uma isoforma putativa do CD226, agindo tanto como uma proteína não funcional ou com uma nova função. Outra hipótese seria que esta troca poderia desregular a cascata de sinalização intracelular por alterar os sítios de fosforilação localizados na posição 322 e 329, importantes na sinalização induzida pelo CD226^{71,81}.

3 - JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Até o momento, o principal determinante genético para o diabetes tipo 1 está localizado no complexo do HLA que, associado aos demais genes de susceptibilidade, contribui com aproximadamente 50% do risco. Acredita-se que outros possíveis genes candidatos estejam envolvidos com ações do sistema imunológico, principalmente com as funções exercidas pelas células T. O entendimento das alterações desencadeadas por estes e de seus mecanismo de risco, permitiriam o desenvolvimento de melhores estratégias de predição e prevenção do diabetes tipo 1A.

A molécula, CD226, está envolvida tanto em processos das vias de imunidade inata como adquirida. Participa da diferenciação de células T CD4+, do processo de citotoxicidade mediado por células NK e da interação intracelular^{29,82}. Seu gene está situado na região cromossômica 18q22, associada a risco para DM1A. Assim, é fundamental definir seu papel como determinante de susceptibilidade no desenvolvimento desta doença⁸³.

Até o momento a maioria dos estudos com o gene CD226 foi realizado em populações caucasianas com poucos dados referentes a outras populações. Apesar do rs763361 ter sido identificado como uma variante de risco para DM1A não há estudos dissociando-o dos efeitos dos alelos do HLA, ou que tenham definido seu papel nas demais manifestações de autoimunidade do DM1A. Além disso, poucas variantes alélicas foram pesquisadas, justificando a extensão do estudo para todo o gene.

A grande heterogeneidade de nossa população justifica a continuidade da definição dos marcadores genéticos que estejam relacionados ao DM1A no nosso meio.

4 - OBJETIVOS:

Esse estudo teve como objetivo:

1. Investigar a presença de polimorfismos ou mutações no gene *CD226* que pudessem estar associadas à susceptibilidade ao DM1A.
2. Determinar a interação de eventuais variantes de risco para DM1A encontradas no gene *CD226* com:
 - a) Características fenotípicas de nossa população
 - b) alelos –DR do sistema HLA
 - c) expressão de autoimunidade (autoanticorpos pancreáticos e extra pancreáticos).

5 - MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Considerações Éticas

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. O protocolo de estudo foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) e aprovado- Protocolo de Pesquisa 0126/08 (anexo1). Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes ou responsáveis, antes do início dos procedimentos necessários.

5.2 Casuística

A Avaliação do gene *CD226* foi realizada a partir do material genético do Banco de DNA de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1 A (Protocolo de Pesquisa CAPPesq nº 1169/05.) pertencente aos Laboratórios de Investigação Médica- Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios- LIM 18 e Laboratório de Genética Molecular – LIM 25 da Faculdade de Medicina da USP .

As coletas de sangue para avaliação dos marcadores imunológicos e genéticos, bem como as dosagens de glicemia, hemoglobina glicada e peptídeo C foram feitas após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido pós-informação. Dados descritivos foram auto referidos.

Neste estudo foram incluídos 532 diabéticos tipo 1A que preenchiam os seguintes critérios:

- hiperglicemia com sintomas específicos para diabetes ou episódio de cetoacidose ao diagnóstico.
- presença de um ou mais autoanticorpos pancreáticos positivos e/ou HLA de risco para a doença.
- necessidade de tratamento precoce e mantido com insulina.

Foram excluídos do estudo os pacientes com diabetes de outras etiologias.

O grupo controle foi constituído de 594 indivíduos saudáveis, sem história de doença autoimune ou de diabetes tipo 1 na família.

5.3 Avaliação Bioquímica

5.3.1 Glicemia

Para a dosagem de glicemia plasmática utilizou-se o método enzimático-colorimétrico, específico: sistema (glicose oxidase-peroxidase), kit comercial LABTEST GOD-ANA (Brasil). Os valores normais foram de 70 a 99 mg/dL, em jejum.

5.3.2 Hemoglobina Glicada

O valor de hemoglobina glicada (HbA1c) nas amostras sanguíneas, foi obtido por HPLC (CLAE). Os valores normais foram considerados entre 4,1% a 6,0%.

5.3.3 Peptídeo C

O método utilizado foi imunofluorométrico (IFMA), com a determinação em soro obtido de sangue em jejum. Valores de referência: 0,4 a 3,6 ng/mL.

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

As dosagens dos anticorpos anti-GAD65 e anti-IA2 foram realizadas por radioimunoensaio com reagentes da RSR (*Glutamic Acid Decarboxylase auto antibody and IA-2 auto antibody RIA kit from RSR, UK*), onde 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 conjugada. O imunocomplexo marcado agregado foi separado por centrifugação e a quantificação do I^{125} , presente no precipitado contendo o imunocomplexo, foi efetuada em contador gama automático (Cobra II, Perkin-Elmer). A quantificação dos anticorpos foi realizada por extrapolação, a partir de curvas padrão realizadas no mesmo ensaio, com a de anti-GAD variando entre 0,1U/mL a 300U/mL e com a de anti-IA2, variando entre 0,1 a 50 U/mL. (Schimidli et al., 1994; Schmidli et al., 1995).

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

Foram consideradas negativas as amostras com anti-GAD $\leq 1,0$ U/mL (98,9% dos controles). Os valores > 1 U/mL foram considerados positivos.

Em relação ao anti-IA2, os valores médios da população controle foram $0,10 \pm 0,23$ U/mL. Amostras com anti-IA2 variando entre 0 a 0,8 U/mL (98,9%) foram consideradas negativas. Os valores $> 0,8$ U/mL foram considerados positivos.

5.3.5 Auto Anticorpos Extrapancreáticos

5.3.5.1 Anti-enzima 21-hidroxilase (anti-21 OH)

Utilizou-se o radioimunoensaio (*21-OH Auto antibody RIA kit from RSR Limited, UK*). Após incubação do soro com o antígeno 21-OH hidroxilase marcado com iodo radioativo, o imunocomplexo obtido foi separado e centrifugado. A presença do auto-anticorpo foi avaliada utilizando-se as contagens radioativas e curva padrão realizada no ensaio. Valores menores ou iguais a 1 U/mL, de unidade arbitrária fornecida pelo fabricante, foram consideradas negativas.

5.3.5.2 Anti-célula Parietal (anti-CP) e Anti-músculo Liso (anti-AML)

Dosados por Imunofluorescência Indireta em lâminas de microscópio fixadas com tecido de parede de estômago de rata. Foram considerados normais os negativos, não reagentes.

5.3.5.3 Anti-tireoperoxidase (anti-TPO) e Anti-tireoglobulina (anti-TG)

Utilizou-se o método de Fluoroimunoensaio indireto (Auto Delfia TPO Ab kit and Auto Delfia hTgAb kit, Turku, Finland). Foram considerados negativos valores ≤ 35 U/mL.

5.3.5.4 Anti-receptor do TSH (TRAB)

O método utilizado foi o Radiorreceptor marcado com iodo radioativo (TSH receptor Auto antibody kit RSR, Turku, Finland). Valores de referência: <8% negativo; 8 a 19 duvidoso; >19% positivo.

5.3.5.5 Fator anti-nuclear (FAN)

Dosado por imunofluorescência indireta em células HEp-2. Qualquer teste positivo (diluição 1/40) para anticorpos anti-núcleo por IFI em Hep2 foi titulado até 1/1280. Foram considerados não reagentes títulos $<1/80$ (título de reatividade mínima de acordo com o 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células Hep-2⁸⁴).

5.3.5.6 Fator reumatóide (FR)

Dosado por nefelometria. Valor de referência $<20\text{UI/mL}$.

5.3.5.7 Anti-microsomal do fígado e rim (Anti-LKM-1)

Dosado por imunofluorescência indireta através de lâminas de microscópio fixadas com cortes de tecido hepático e renal de rato. Foram considerados negativos os não reagentes.

5.3.5.8 Anti-endomísio

Dosado por imunofluorescência indireta a partir de cortes finos e congelados de cordão umbilical incubados com o soro do paciente e diluídos na proporção de 1:5 (interação antígeno-anticorpo). Testes com fluorescência ao microscópio $>1/10$ foram considerados positivos⁸⁵.

5.3.5.9 Anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA)

Dosado por imunofluorescência indireta em neutrófilos humanos de sangue periférico. Resultados não reagentes foram considerados negativos.

5.4 Estudo Molecular

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

5.4.1 Genotipagem do Sistema HLA (-DR)

A amplificação dos alelos HLA-DRB1 foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) alelo específica (PCR SSP-*Sequence Specific Primers*) utilizando o conjunto diagnóstico de tipagem para DRB1 genérico (Micro SSP™ HLA DNA *Typing Trays One-Lambda INC*). O conjunto para análise dos alelos DRB1 é constituído por 23 diferentes oligonucleotídeos iniciadores de seqüências específicas e do gene da β-globina humano utilizado como controle interno da reação. Acrescentou-se aos tubos contendo os iniciadores: mistura de oligonucleotídeos, alíquotas de DNA (100 ng/μL) e a enzima Taq-DNA-Polimerase 5 U/μL (volume de 2,5 μL para DRB1). A seguir foram submetidos à amplificação com ciclos pré-definidos pelo fabricante em termociclador MJ, com o seguinte programa de ciclagem: 1) 96°C -2min e 10 seg., 2)61°C -1min, 3)96°C -10 seg., 4)61°C-1min., 5)repetir as etapas 3 e 4 -8 vezes., 6)96°C-10 seg., 7)57°C -50 seg., 8)72°C- 30 seg., 9) repetir etapas 6 a 8 19 vezes, finalizando em 15°C. As amostras de DNA amplificado foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2,5%), coradas com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas após exposição à luz ultravioleta por sistema de fotografia e as fotos arquivadas em computador e analisadas

através de programa específico fornecido pelo fabricante (*One Lambda DNA/LMT versão 3.8*)

5.4.2 Amplificação das regiões codificadoras (exons) e flangeadoras do gene *CD226*

5.4.2.1 Reação em Cadeia da Polimerase

O gene *CD226*, localizado na região cromossômica 18q22, é composto por 7 exons. Apenas o primeiro exon e parte do sétimo não foram incluídos no processo de amplificação por serem transcritos, mas não traduzidos. Para análise das demais regiões foram construídos 6 pares de iniciadores (*primers*) descritos no quadro 1, com as respectivas temperaturas de pareamento (*annealing*). Alguns iniciadores sofreram pequenas modificações nas suas temperaturas de pareamento para obtenção de melhor resultado.

A sequência referência do gene foi baseada no banco de dados Ensembl (www.ensembl.org), referência: ENSG00000150637.

Tabela 1: Iniciadores utilizados na reação de PCR e sequenciamento das regiões codificadoras e flangeadoras do gene *CD226*

Iniciadores	Sequência	Temperatura de pareamento	Fragmento (pb)
DNAM-2R	5'AggCCTTTTCCTgTgTTCA3'	59°C	947
DNAM-2F	5'AAAAGgCgTCCTgCTgATAA3'	59°C	540
DNAM-3R	5'TTATCAgCAgACgCCTTTT3'	59°C	540
DNAM-3F	5'ggAATTggAATgCCACA3'	59°C	947
DNAM-4F	5'gTATCTTCCAgTTgggTgTCC3'	59°C	461
DNAM-4R	5'ggCTggCTTTTCCATgTT 3'	59°C	461
DNAM-5F	5'CTgCCTTACTTTTTACTgCCTTT3'	59°C	247
DNAM-5R	5'gCAgACCACCAgCTTCTACC3'	59°C	467
DNAM-6F	5'CTgggAgCAATTTggAgAAg3'	59°C	372
DNAM-6R	5'gCAACTgCATggTCAggTTA3'	59°C	372
DNAM-7F	5'gggAgAgggAgTTCTACATTgA3'	59°C	478
DNAM-7R	5'ggTAgACCTTgggTAgTggAAA3'	59°C	478

PCR: reação em cadeia da polimerase; pb: pares de base; R: antisense; F: sense.

O volume final de 25µL de cada reação continha os reagentes nas seguintes concentrações: 100 ng de DNA genômico, 10mM de cada dNTP (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad CA, EUA), 10pmol do iniciador (Invitrogen™ Life Technologies, Brasil), 5UL/µL da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Brasil), tampão de reação 10x e MgCl₂ 50mM, ambos fornecidos pelo fabricante. A amplificação foi realizada no termociclador Veriti 96well (Applied Biosystems-Life technologies, Foster City, CA, USA). O protocolo de amplificação consistiu de um ciclo de 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, temperatura de alinhamento (59-62°C), de acordo com os iniciadores por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando a 15°C. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio 10mg/mL (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) utilizando, como marcador de peso molecular, o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™ Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). As amostras foram visualizadas e analisadas sob transiluminação em luz ultravioleta (Electronic U.V. Transiluminator- ultra Lum) e em, seguida, fotografadas no fotodocumentador (Vilber Loumart) para posterior análise dos fragmentos amplificados. A figura 2 mostra a representação no gel de agarose dos fragmentos amplificados pela PCR.

Figura 2: Foto do Gel de Agarose a 2%, demonstrando o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase do gene CD226.

5.4.2.2 Sequenciamento automático

Para o sequenciamento foram utilizados apenas os produtos amplificados, obedecendo aos critérios de fragmento de banda única e concentrações ≤ 20 ng/ μ L, estimada através da comparação com fragmentos do marcador de massa molecular *Low DNA mass Ladder* (Invitrogen™ Life Technologies, Brasil) em gel de agarose 2%, marcado com brometo de etídio. Posteriormente, 5 μ L do produto de amplificação foi submetido à purificação enzimática com a adição de 2 μ L da ExoSAP-IT-combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I (USB Corporation- GE Healthcare). O volume final de 7 μ L foi incubado a 37°C por 15 minutos, para degradar o excesso de iniciadores e nucleotídeos, e durante 15 minutos adicionais a 80°C, para inativação da enzima. Decorrida esta etapa, os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento. O protocolo consistiu na adição de: 1,5 μ L de “Big Dye” (ABI Prism® Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits- Applied Biosystems-Life Technologies), 0,5 μ L do iniciador a 10pMol (Forward ou Reverse) juntamente com 6,0 μ L do Tampão “Save Money” (Applied Biosystems Life Technologies). Esses produtos foram submetidos à precipitação com EDTA (125mM)/Acetato de Na(3M)/Ethanol PA (Merck Reagentes), de acordo com as recomendações da Applied Biosystems-Life Technologies.

Os produtos de sequenciamento foram então submetidos à eletroforese capilar e analisados em seqüenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer XL 3130 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems/Hitachi). Os cromatogramas foram comparados com seqüências depositadas em Banco de dados (www.ensembl.org) e lidos nos programas Chromas Lite 2 e Sequencher 4.8.

5.4.2.3 Genotipagem de SNP (Ensaio da 5'nuclease – *TaqMan Genotyping Assay*)

A análise das variantes rs1788101, do exon 5, rs763361 e rs727088, do exon 7, do gene CD226, utilizou o ensaio de genotipagem *TaqMan* (Applied Biosystems- Life Technologies). O ensaio é realizado simultaneamente com uma reação de PCR e os resultados lidos em tempo real. Três componentes são necessários: ensaio de genotipagem, DNA e o *Master Mix Universal TaqMan*. O ensaio de genotipagem contém dois *primers* para amplificar a sequência de interesse e duas sondas (Minor Groove Binder), cada uma com um marcador específico de fluorescência (VIC na região 5' proximal da sonda do alelo 1 e FAM para sonda do alelo 2) e com um repressor de fluorescência na região 3' proximal da sonda. Durante a PCR cada sonda alinha-se, especificamente, com uma sequência complementar entre os sítios de iniciadores, a qual estando intacta, não emite fluorescência. A *AmpliTaQ Gold® DNA polymerase*, contida no *Master Mix Universal TaqMan*, quebra sondas hibridizadas, desinibindo o sinal de fluorescência (figura 3) . Para cada reação atingiu-se o volume final de 10µL contendo: água Milli-Q- 3,5 µL; ensaio TaqMan- 0,5µL; master mix TaqMan- 5µL e DNA (10ng/ µL) -1 µL. A amplificação foi realizada no aparelho *StepOnePlus* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) seguindo o protocolo especificado pelo fabricante: 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 92°C, seguidos por 1 minuto a 60°C.

Discriminação alélica

Figura 3: Resultado segundo emissão de fluorescência analisada por genotipagem (*TaqMan*).

6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad InStat versão 2.00 (La Jolla, CA, USA) e pelo programa SPSS versão 13 (SPSS inc., Chicago, IL-USA). As variáveis categóricas foram expressas em valores absolutos e relativos (frequências). Utilizou-se o teste do Qui quadrado, para a comparação das variáveis qualitativas entre os grupos. O teste exato de Fisher foi utilizado para pequenas amostras. Os resultados das variáveis quantitativas foram apresentados como média±desvio padrão (DP). Associação entre as variáveis numéricas com distribuição paramétrica foi realizada através do *teste t de Student* e para as não paramétricas, pelo teste de *Mann-Whitney*. O valor do *Odds Ratio* (OR) foi calculado pela correção de Woolf. Variáveis de risco significativo para o DM1A tiveram o OR ajustado por regressão logística para possíveis fatores de confusão.

No estudo dos genótipos, o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado através do teste do Qui quadrado. A fase e as frequências dos haplótipos a partir dos genótipos de polimorfismos de cada indivíduo foram estimadas através do método bayesiano implementado no programa PHASE v.2.1.1). O software CubeX: Cubic Exact Solution (www.oege.org/software/cubex), foi utilizado para avaliação de desequilíbrio de ligação entre as variantes de interesse. O modelo recessivo foi utilizado para a associação entre os genótipos.

No estudo genético, o valor do *P* foi ajustado através do método de Bonferroni para o número de comparações ou de alelos testados que apresentassem incidência >5% na população.

Os resultados estatísticos com $P < 0,05$ foram considerados significativos.

7 - RESULTADOS

7.1 Estratégia do Estudo

Participaram deste estudo 532 pacientes portadores de DM1A e 594 indivíduos controles. Foram submetidos à dosagem de glicose, HbA1c, peptídeo C, autoanticorpos pancreáticos e extra pancreáticos e análise genética do Sistema HLA (alelos DR). Em uma primeira etapa foi averiguada, através de sequenciamento direto do DNA genômico de um subgrupo de 106 pacientes DM1A e 102 controles, a presença de variantes ou mutações nas regiões codificadoras e flanqueadoras do gene *CD226*. Posteriormente, variantes de interesse, selecionadas na primeira etapa ou sugeridas na literatura como de interferência funcional, foram genotipadas pelo ensaio *TaqMan* para os demais participantes. Variantes de susceptibilidade para DM1A foram relacionadas com as características fenotípicas pertinentes à doença e à expressão de autoimunidade.

7.2 Caracterização da População Estudada

As características clínicas dos grupos estão apresentadas na tabela 2. Os portadores de DM1A compreendiam o grupo mais jovem quando comparados com os controles ($P=0,000$), com predomínio de caucasóides e do sexo feminino ($P<0,0001$).

Tabela 2: Características Clínicas de pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles

Variável	DM1A		Controles		P
	n (%)	Média±DP	n (%)	Média±DP	
Etnia					
Caucasóide	423(81,35)	-	352(61,75)	-	<0,0001 ^a
Não Caucasóide	97(18,65)	-	218(38,25)	-	
Sexo					
Masculino	216(40,6)	-	366(61,6)	-	
Feminino	316(59,4)	-	228(38,4)	-	
Idade (anos)		23,92±12,79	590	27,98±11,56	0,0000 ^c
Idade de diagnóstico (anos)		11,6 ± 7,5	-	-	-
Duração da doença (anos)		12,2 ± 10,27	-	-	-

N= número de indivíduos; DP=desvio padrão; ^a Teste do Qui- quadrado; ^c Teste de Mann Whitney

No grupo de portadores de diabetes, a idade média de diagnóstico foi 11,6±7,5 anos, com duração da doença de 12,2±10,27 anos. Glicemia de jejum e HbA1c foram maiores ($P=0,0000$) e as concentrações de peptídeo C, menores, quando comparadas às do grupo controle ($P=0,0000$) (tabela 3). Os autoanticorpos pancreáticos tinham títulos mais elevados e eram mais frequentes nos pacientes. O anti-GAD estava presente em 44% dos pacientes *versus* 1,3% dos controles e o anti-IA2, em 41,6% *versus* 1,9 % dos controles ($P<0,01$).

Tabela 3: Características laboratoriais de pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles

Variável	DM1A	Controles	P ^c
	Média ± DP	Média ± DP	
Glicemia (mg/dL)	192 ± 114,58	83,23 ± 9,3	0,0000
HbA1c %	8,6 ± 2,17	5,31 ± 0,55	0,0000
Anti-GAD (U/mL)	9,1 ± 20,3	0,1 ± 0,5	0,0000
Anti-IA2 (U/mL)	6,3 ± 30,6	0,1 ± 0,2	0,0000
PepC (ng/dL)	0,32 ± 0,32	2,0 ± 1,4	0,0000

DP=desvio padrão; HbA1C=hemoglobina glicada; PepC=PeptídeoC; Anti-GAD=anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico 65; Anti IA2=anticorpo anti- tirosina fosfatase; ^c Teste de Mann Whitney.

Em relação aos anticorpos extra pancreáticos, o número de indivíduos avaliados e as frequências dos autoanticorpos estão expostos na tabela 4. Os autoanticorpos: anti-21-OH, anti-CP, FAN, anti-TPO anti-Tg e TRAb foram mais frequentes no grupo de pacientes com DM1A quando comparados com os controles .

Tabela 4: Distribuição dos autoanticorpos extra pancreáticos em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles

Autoanticorpos	Controles n (%)	DM1A n (%)	P
Anti-21OH			
Negativo	151(51,5)	142(48,5)	
Positivo	01(11,1)	08(88,9)	0,0191 ^a
Anti-CP			
Negativo	214(55,3)	173(44,7)	
Positivo	0	12(100)	<0,0001 ^a
Anti-ML			
Negativo	240(55,4)	193(44,6)	
Positivo	02(22,2)	07(87,8)	0,0855 ^a
FR			
Negativo	272(51,0)	199(49,0)	
Positivo	03(37,3)	06(66,7)	0,1801 ^a
Anti-endomísio			
Negativo	-	152(100)	
Positivo	-	11(100)	-
Anti- LKM-1			
Negativo	240(58,7)	169(41,3)	
Positivo	01(50,0)	1(50,0)	1,000 ^a
ANCA			
Negativo	-	109(100)	
Positivo	-	2(100)	-
FAN			
Negativo	251(58,1)	181(41,9)	
Positivo	10(17,0)	49(83,0)	<0,0001 ^a
Anti-TPO			
Negativo	371(64,0)	208(36,0)	
Positivo	51(44,0)	65(56,0)	<0,0001 ^b
Anti-Tg			
Negativo	397(65,4)	210 (34,6)	
Positivo	31(32,3)	65 (67,7)	<0,0001 ^b
TRAB			
Negativo	270(65,7)	141(34,3)	
Positivo	1(8,3)	11(92,7)	<0,0001 ^a

Anti-21-OH= anti-21 hidroxilase; anti-CP= anti- célula parietal; anti-ML= anti-músculo liso; FR=fator reumatóide; anti-LKM-1= anti-microssomal do fígado e rim; ANCA= anti-citoplasma do neutrófilo; FAN= anti-núcleo; anti-TPO= anti -tireoperoxidase; anti-Tg= anti-tireoglobulina; TRAB=anti-receptor do TSH; n= número de indivíduos; ^a teste exato de Fisher; ^bteste Qui quadrado.

7.3 Alelos do Sistema HLA DR

A frequência dos alelos DR e dos genótipos mais incidentes em DM1A em relação ao grupo controle estão nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Os alelos HLA-DR3, -DR4 e -DR9 predominaram no grupo DM1A e os alelos -DR2,-DR5,-DR6 e DR7, no controle (Tabela 5).

Tabela 5: Frequência dos alelos HLA-DR em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles

Alelo	DM1A n (%)	Controles n (%)	OR	IC	P
DR1	82(9,1)	118(10,7)	0,840	0,624a 1,131	0,2829 ^b
DR2	41(4,7)	171(15,4)	0,261	0,183 a 0,372	<0,0001 ^b
DR3	272(30,3)	103(9,3)	4,227	3,300a 5,416	<0,0001 ^b
DR4	281(31,3)	138(12,5)	4,299	3,355a 5,503	<0,0001 ^b
DR5	37(4,1)	135(12,2)	0,308	0,212 a 0,449	<0,0001 ^b
DR6	59(6,5)	224(20,2)	0,276	0,204 a 0,374	<0,0001 ^b
DR7	55(6,1)	122(11,0)	0,525	0,377a 0,732	0,0002 ^b
DR8	30(3,3)	64(5,8)	0,562	0,361a 0,875	0,0134 ^b
DR9	33(3,7)	5(1,3)	2,772	1,496a 5,138	0,0013 ^a
DR10	8(0,9)	20(1,8)	0,487	0,213a 1,113	0,1209 ^a
Total	898	1110	-	-	-

^aTeste exato de Fisher; ^bteste do Qui Quadrado; n= número de indivíduos; OR = Odds ratio; IC= Intervalo de Confiança; P crítico corrigido por Bonferroni para 13 testes não independentes P <0,00385.

Os genótipos DR3/DR3, DR3/DR4, DR4/DR4 prevaleceram no grupo dos pacientes com DM1A (tabela 6), com maior frequência do genótipo não DR3/não DR4 (DRx/DRx) nos controles.

Tabela 6: Frequência dos genótipos HLA -DR mais prevalentes em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles

Genótipo	DM1A n (%)	Controles n (%)	<i>P</i>	OR	IC
DR3/DR3	37(8,2)	7(1,2)	<0,0001 ^a	7,031	3,102 a 15,93
DR3/DR4	116(25,8)	8(1,4)	<0,0001 ^a	23,676	11,41 a 49,10
DR4/DR4	22(4,9)	8(1,4)	0,0023 ^a	3,523	1,553 a 7,992
DR3/DRx	82(18,2)	81(14,6)	0,1386 ^b	1,307	0,934 a 1,830
DR4/DRx	121(27,0)	114 (20,5)	0,0209 ^b	1,427	1,065 a 1,913
DRx/DRx	71(15,8)	337(60,7)	<0,0001 ^b	0,121	0,089 a 0,164
Total	449	555			

^aTeste exato de Fisher; ^bteste do Qui Quadrado; n= número de indivíduos DRx = não DR3/não DR4; OR = Odds ratio; IC= Intervalo de Confiança; *P* crítico corrigido pelo método de Bonferroni $P < 0,0083$.

7.4 Gene CD226

7.4.1 PCR e Sequenciamento

O sequenciamento das regiões codificadoras e flanqueadoras do gene CD226 identificou 12 variantes previamente descritas na base de dados Ensembl (www.ensembl.org), sendo 03 localizadas em exons. Nenhuma variante nova foi encontrada. Um polimorfismo do intron 2 (rs80076366), já registrado, não pode ser adequadamente estudado nesta população devido a uma região de deslizamento “*slipaged*” do DNA (sucessão de timina) situada logo após sua localização (fita sense), dificultando sua leitura. As variantes rs77826708 ($P=0,000$), rs62090790 ($P=0,000$), rs763362 ($P=0,0252$) e rs763361 ($P=0,0141$) não estavam em equilíbrio de Hardy Weinberg no grupo dos portadores de DM1A.

Destas 12 variantes, apenas a rs1788101 A/C, localizada na região – 12 do intron 5 teve frequência alélica diferente nos dois grupos: a presença do alelo C, apesar de predominar nos portadores de diabetes ($P=0,0436$), não foi estatisticamente significativa após correção por Bonferroni. O genótipo AA do rs763361, no exon 7, sugerido como de susceptibilidade ao DM1, não diferiu entre os grupos (tabelas 7 e 8).

Tabela 7: Frequência alélica e genotípica das variantes intrônicas do *CD226* identificadas pela PCR e sequenciamento em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles

Região	Variantes	DM1A	n (%)	Controles	n(%)	OR	IC	P
Intron 2	(rs75418532) A/G	AA	101(95,3)	AA	97(97,5)	1,041	0,30 a 3,77	1,0000 ^a
		AG	5 (4,7)	AG	5(2,5)			
		A	207(97,6)	A	199(97,5)	1,041	0,30 a 3,64	1,0000 ^a
		G	5(2,4)	G	5(2,5)			
	(rs57743896) G/A	GG	106(100)	GG	100(98,0)	0,251	0,25 a 111,8	0,2000 ^a
		G	212(100)	GA	2(2,0)			
				G	202(99,0)	5,247	0,25 a 110,0	0,2447 ^a
				A	2(1,0)			
Intron 4	(rs1630425) G/T	GG	102(98,0)	GG	101(99,0)	0,252	0,02 a 2,29	0,3694 ^a
		GT	4(2,0)	GT	1(1,0)			
		G	208(98,1)	G	203(99,5)	0,256	0,02 a 2,31	0,3794 ^a
		T	4(1,9)	T	1(0,5)			
Intron 5	(rs73970293) C/T	CC	98(99,0)	CC	100(98,0)	1,960	0,17 a 21,9	1,0000 ^a
		CT	1(1,0)	CT	2(2,0)			
		C	197(99,5)	C	202(99,0)	1,950	0,17 a 21,6	1,0000 ^a
		T	1(0,5)	T	2(1,0)			
	(rs77826708) A/T	AA	102(96,2)	AA	53(98,1)	0,481	0,05 a 4,41	0,6635 ^a
		AT+TT	4(3,8)	AT	1(1,9)			
		A	250(97,3)	A	107(99,0)	0,333	0,04 a 2,74	0,2737 ^a
		T	07(2,7)	T	1(1,0)			
	(rs1788101) A/C	AA	74(69,8)	AA	83(81,4)	0,276	0,27 a 1,01	0,0554 ^a
		AC+CC	32(30,2)	AC+CC	19(18,6)			
		A	176(83,0)	A	184 (90,2)	0,531	0,29 a 0,95	0,0436^a
		C	36(17,0)	C	20(9,8)			
Intron 6	(rs3737395) T/C	TT	102(96,2)	TT	100 (98,0)	0,510	0,09 a 2,84	0,6833 ^a
		TC	4(3,8)	TC	2(2,0)			
		T	208(98,1)	C	202(99,0)	0,51	0,09 a 2,84	0,6856 ^a
		C	4(1,9)	T	2(1,0)			
	(rs62090790) C/T	CC	100(94,3)	CC	93(91,2)	1,613	0,55 a 4,70	0,2467 ^a
		CT+TT	6(5,7)	CT	9(8,8)			
		C	203(98,5)	C	195(95,6)	1,041	0,40 a 2,67	1,0000 ^a
		T	9(1,5)	T	9(4,4)			
Intron 7	(rs763362) T/C	TT	43(40,6)	TT	39(38,3)	1,103	0,63 a 1,92	0,2126 ^b
		TC+CC	63(59,4)	TC+CC	63(51,7)			
		T	109(55,9)	T	126(61,7)	0,784	0,52 a 1,17	0,6882 ^b
		C	86(44,1)	C	78(38,3)			

PCR=reação em cadeia de polimerase; ^ateste exato e Fisher; ^bteste do Qui quadrado; n= número de indivíduos; P crítico corrigido pelo método de Bonferroni (P<0,00625).

Tabela 8: Frequência alélica e genotípica das variantes exônicas do *CD226* identificadas pela PCR e sequenciamento em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles

Região	Variantes	DM1A	n (%)	Controle	n(%)	OR	IC	P
	(rs72481820) G/A	GG	89(87,2)	GG	89 (87,2)	0,764	0,35 a 1,66	0,5000 ^a
		AG+AA	17(12,8)	AG	13 (12,8)			
		G	193(91,0)	G=191	191(93,7)	0,691	0,33 a 1,44	0,3600 ^a
		A	19(9,0)	A=13	13 (6,3)			
Exon 6	(rs72481819) G/A	GG	101(95,3)	GG	91(89,2)	2,442	0,81 a 7,29	0,1221 ^a
		AG	5 (4,7)	AG	11(10,8)			
		G	207 (97,6)	G	193(94,6)	2,360	0,80 a 6,91	0,1295 ^a
		A	5 (2,4)	A	11(5,4)			
		AA	38 (35,8)	AA	24 (23,5)	1,816	0,99 a 3,32	0,0734 ^b
Exon 7	(rs763361) A/G	AG+GG	68 (64,2)	AG+GG	78 (76,5)			
		A	116 (54,7)	A	102(50,0)	1,208	0,82 a 1,77	0,3770 ^b
		G	96 (45,3)	G	102(50,0)			

PCR=reação em cadeia de polimerase; ^ateste exato e Fisher; ^bteste do Qui quadrado; n= número de indivíduos P crítico corrigido pelo método de Bonferroni ($P<0,00625$)

7.4.2 Genotipagem

7.4.2.1 Genotipagem: variantes rs1788101, rs763361, rs727088 do gene *CD226*

Ampliamos a amostra através do processo de genotipagem por PCR em tempo real para as variantes rs1788101 (A/C) e rs763361 (A/G), esta última associada com DM1A e autoimunidade em outras populações⁸⁰. Além desses dois polimorfismos, incluímos o rs727088 (C/T), localizado na região 3'UTR do *CD226* e recentemente implicado com menor expressão do transcrito e baixos níveis da proteína CD226. No total foi analisado o material genético de 532 diabéticos e 594 controles.

O genótipo AA do rs763361 ($P=0,0054$) e o CC do rs727088 ($P=0,0143$) predominaram em portadores de DM1A quando comparados com o grupo controle. Esta diferença foi mantida após correção por Bonferroni ($P<0,0166$) (tabela 9). Já o alelo C do rs1788101 não foi associado à susceptibilidade ao diabetes.

O cálculo para o Equilíbrio de Hardy Weinberg mostrou que as variantes rs763361 e rs727088 não estavam em equilíbrio nos grupos de diabéticos ($P=0,0286$) e controles ($P=0,0186$), respectivamente.

Tabela 9: Frequência alélica e genotípica das variantes rs1788101, rs763361 e rs727088 do CD226 em pacientes portadores de diabetes tipo 1A (n=532) e controles (n=594)

Variantes	DM1A n(%)	Controles n(%)	OR	IC	P ^b
rs1788101					
Genótipos					
AA	286(67,9)	294(70,8)	0,8719	0,65 a 1,17	0,4022
AC+CC	135(32,1)	121(29,2)			
Alelos					
A	690 (82,0)	695(83,7)	0,8818	0,68 a 1,13	0,3659
C	152 (18,0)	135(16,3)			
rs763361					
Genótipos					
A A	178(33,5)	152(25,7)	1,453	1,12 a 1,8	0,0054
AG+GG	353(66,5)	438(74,3)			
Alelos					
A	593(55,8)	306(51,5)	1,17	0,99 a 1,38	0,0716
G	469(44,2)	288(48,5)			
rs727088					
Genótipos					
CC	166(31,4)	134(24,6)	1,410	1,08 a 1,84	0,0143
CT+TT	362(68,6)	412(75,4)			
Alelos					
C	576 (54,5)	568 (52,0)	0,9033	0,76 a 1,07	0,2576
T	480 (44,5)	524 (48,0)			

^bTeste do Qui quadrado; n= número de indivíduos ; OR = Odds ratio ; IC= Intervalo de Confiança; P corrigido pelo método de Bonferroni <0,0166

7.4.2.2 Características dos pacientes DM1A de acordo com genótipo/alelo da variante rs763361 do CD226

No grupo de diabetes tipo 1A, os portadores do alelo A, da variante rs763361, apresentaram maior frequência de anti-GAD e de peptídeo C com valores $\leq 0,5\text{ng/mL}$, mas estas associações não foram significativas após correção por Bonferroni ($P < 0,007$). Portadores do genótipo AA apresentaram ainda menores valores séricos de peptídeo C quando comparado com os genótipos AG+GG (P corrigido $< 0,016$). Demais parâmetros clínicos e laboratoriais foram semelhantes nos dois grupos (tabelas 10 e 11).

Os alelos de risco do HLA- DR3/DR4 estavam presentes em 86,5% dos portadores do genótipo AA comparado com 83% nos genótipos AG+GG ($P = 0,3403$) e em 85% dos portadores do alelo A comparado com 82,6% dos portadores do alelo G ($P = 0,3180$) não diferindo entre os grupos.

Tabela 10: Frequência dos genótipos e alelos da variante rs763361 do *CD226* segundo as características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de diabetes tipo 1A

Variável	AA n(%)	GG+AG n(%)	P	A n(%)	G n(%)	P
Etnia						
Caucasóides	137(32,5)	284(67,5)	0,1035 ^b	467(55,4)	375(44,6)	0,300 ^b
Não Caucasóide	40(41,2)	57(58,8)		116(59,8)	78(40,2)	
Sexo						
Masculino	67(31,1)	148(68,9)	0,3422 ^b	233(54,2)	197(45,8)	0,405 ^b
Feminino	111(35,1)	205(64,9)		360(57,0)	272(43,0)	
Idade de diagnóstico						
≤15 anos	116(41,5)	244(58,5)	0,2329 ^b	388(53,8)	332(46,2)	0,074 ^b
>15 anos	49(23,7)	78(76,3)		154(60,6)	100(39,4)	
Anti-GAD-65 [†]						
presente	27(41,5)	38(58,5)	0,0872 ^a	85(65,4)	45(34,6)	0,0102^b
ausente	09(23,7)	29(76,3)		35(46,0)	41(54,0)	
Anti-IA2 [†]						
presente	25(35,2)	46(64,8)	1,0000 ^a	82(57,7)	60(42,3)	0,9180 ^b
ausente	11(35,5)	20(64,5)		37(66,0)	25(34,0)	
Pep C ng/mL [†]						
>0,5	08(25,0)	24(75,0)	0,0651 ^a	32(50,0)	32(50,0)	0,0456^a
≤0,5	15(50,0)	15(50,0)		41(68,3)	19(31,7)	
HLA DR						
DR3 ou DR4	129(34,2)	248(65,8)	0,3403 ^a	425(56,3)	329(43,7)	0,3180 ^a
DRx/DRx	20(28,1)	51(17,0)		73(51,4)	69(48,6)	

HbA1c=hemoglobina glicada; PepC=Peptídeo C; AntiGAD-65 (anticorpo antidescarboxilase do ácido - 65 glutâmico; Anti IA2(anticorpo anti- tirosina fosfatase); [†]análise realizada em pacientes com até dois anos de duração do diabetes;DRx: não- DR3/-DR4; n= número de indivíduos; P= determinado pelo teste exato de Fisher ou teste do Qui quadrado; P crítico corrigido pelo método do Bonferroni<0,007.

Tabela 11: Frequência dos Genótipos do polimorfismo rs763361 do *CD226* em portadores de DM1A com até 2 anos de duração do diabetes e valores séricos de anticorpos anti-GAD, anti-IA2 e de peptídeo C

Variável	AA		AG +GG		<i>P</i> ^c
	n	Média±DP	n	Média±DP	
Anti-GAD	36	16,52 ± 21,7	67	9,78± 16,34	0,0281
Anti-IA2	36	12,46 ± 25,14	66	6,81± 8,46	0,4263
PepC	23	0,4± 0,3	39	0,7±0,53	0,0126

DP: desvio padrão; AntiGAD-65 (anticorpo antidescarboxilase do ácido -65 glutâmico; Anti IA2(anticorpo anti-tirosina fosfatase); PepC: peptídeo C; ^cteste de Mann Whitney, P corrigido pelo método de Bonferroni<0,0166;n= número de indivíduos .

A frequência dos autoanticorpos extra pancreáticos nos pacientes com diabetes, não diferiu entre os portadores do genótipo AA versus AG+GG ou portadores do alelo A versus G da variante rs763361 (tabelas 11 e 12).

Tabela 12: Frequência dos autoanticorpos extra pancreáticos segundo a variante rs763361 do CD226 em pacientes com DM1A

Autoanticorpos	Genótipos		P	Alelos		
	AA n (%)	AG+GG n (%)		A	G	P
Anti-21OH						
Negativo	44(31,2)	97(68,8)		153(54,2)	129(45,8)	
Positivo	03(37,5)	05(62,5)	0,7075 ^a	10(62,5)	06(37,5)	0,6109 ^a
Célula Parietal						
Negativo	57(33,1)	115(66,9)		196(57,0)	148(43,0)	
Positivo	05(41,7)	07(58,3)	0,5419 ^a	15(62,5)	09(37,5)	0,6731 ^a
Musc Liso						
Negativo	66(34,4)	126(65,6)		221(57,5)	163(42,5)	
Positivo	03(42,8)	04(57,2)	0,6953 ^a	09(45,0)	11(55,0)	0,7849 ^a
FR						
Negativo	75(37,9)	123(62,1)		233(58,8)	163(41,2)	
Positivo	0	06(100)	0,0873 ^a	05(41,6)	07(58,4)	0,2501 ^a
Anti endomísio						
Negativo	56(36,8)	96(63,2)		179(58,9)	125(41,1)	
Positivo	06(54,5)	05(45,5)	0,3357 ^a	14(63,6)	8(36,4)	0,8230 ^a
Anti LMK						
Negativo	61(36,0)	108(64,0)		199(58,9)	139(41,1)	
Positivo	0	01(100)	1,0000 ^a	1(50,0)	1(50,0)	1,0000 ^a
ANCA						
Negativo	53(35,5)	96(64,5)		172(57,7)	126(42,3)	
Positivo	1(25,0)	03(75,0)	1,0000 ^a	05(62,5)	03(37,5)	1,0000 ^a
FAN						
Negativo	66(36,6)	114(63,4)		211(58,6)	149(41,4)	
Positivo	19(38,7)	30(61,3)	0,8678 ^a	55(56,1)	43(43,9)	0,7435 ^b
Anti TPO						
Negativo	70(33,6)	138(66,4)		233(56,0)	183(44,0)	
Positivo	27(41,5)	38(58,5)	0,3121 ^b	81(62,3)	49(37,7)	0,2435 ^b
Anti Tg						
Negativo	72(34,3)	138(65,7)		239(56,9)	181(43,1)	
Positivo	26(40,0)	39(60,0)	0,4887 ^b	80(61,5)	50(38,5)	0,4044 ^b
TRAB						
Negativo	52 (36,9)	89(63,1)		165(52,4)	150(47,6)	
Positivo	05 (45,4)	06(54,6)	0,7325 ^a	14(63,6)	08(36,4)	0,3792 ^a

Anti-21-OH= anti-21 hidroxilase; anti -CP= anti- célula parietal; anti-ML= anti-músculo liso; FR=fator reumatóide; anti-LKM-1= anti-microsomal do fígado e rim; ANCA= anti-citoplasma do neutrófilo; FAN= anti-núcleo; anti-TPO= anti -tireoperoxidase; anti-Tg= anti-tireoglobulina; TRAB=anti-receptor do TSH; ^a teste exato de Fisher; ^bteste Qui quadrado; n= número de indivíduos; P crítico corrigido pelo método de Bonferroni<0,0045.

7.4.2.3 Características dos pacientes DM1A de acordo com genótipo/alelo da variante rs727088 do CD226

A análise dos portadores do genótipo CC e do alelo C do rs727088 não mostrou diferença quanto à etnia, sexo, idade de diagnóstico, frequência de anti-GAD, anti-IA2 e de PepC < 0,5ng/dL quando comparados com portadores dos genótipos TT e TC e alelo T (P corrigido < 0,007) (tabela 13). A distribuição dos alelos de risco do HLA,-DR3 e -DR4 também não diferiu quanto ao genótipo CC *versus* TC+TT (87,5% *versus* 82,85%, $P=0,2585$) e quanto ao alelo C *versus* T (85,4% *versus* 83%, $P=0,3706$) sugerindo que não existe desequilíbrio de ligação entre os alelos de risco.

Tabela 13: Frequência dos genótipos e dos alelos da variante rs727088 do CD226 segundo características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de diabetes tipo 1A

Variável	CC n(%)	TC+TT n(%)	P	Alelo C n(%)	Alelo T n(%)	P
Etnia						
Caucasóide	130(31,0)	289(69,0)	0,2209	458(54,6)	380(41,4)	0,6517
Não	36(18,4)	160(81,6)		109(56,7)	83(43,3)	
Caucasóide						
Sexo						
Masculino	64(30)	150(70)	0,5311	229(53,5)	199(46,5)	0,6186
Feminino	102(32,5)	212(67,5)		347(55,2)	281(44,5)	
Idade de diagnóstico						
≤15 anos	109(30,4)	249(69,6)	0,3268	378(52,8)	338(47,2)	0,1203
>15 anos	45(35,7)	81(64,3)		148(58,7)	104(41,3)	
Anti-GAD-65[†]						
presente	25(39,0)	39(61,0)	0,046	81(64,0)	47(36,0)	0,0089
ausente	07(18,4)	31(71,6)		33(43,5)	43(56,5)	
Anti-IA2[†]						
presente	22(31,4)	48(68,6)	1,0000	77(55,0)	63(45,0)	0,8018
ausente	10(32,3)	21(67,7)		36(58,0)	26(42,0)	
Pep C ng/mL[†]						
>0,5	06(18,8)	26(81,2)	0,0512	29(45,3)	35(54,7)	0,0396
≤0,5	13(44,9)	16(55,1)		38(65,5)	20(34,5)	
HLA DR						
DR3 ou DR4	119(31,7)	256(68,3)	0,2585	409(54,5)	341(45,5)	0,3706
DRx/DRx	17(24,3)	53(75,7)		70(50,0)	70(50,0)	

HbA1c=hemoglobina glicada; PepC=Peptídeo C; AntiGAD-65 (anticorpo antidescarboxilase do ácido - 65 glutâmico; Anti IA2(anticorpo anti- tirosina fosfatase); [†]análise realizada em pacientes com até dois anos de duração do diabetes; HLADRx: não -DR3/ -DR4; ^ateste exato de Fisher; ^bteste do Qui quadrado; n= número de indivíduos; P crítico corrigido pelo método do Bonferroni<0,007.

Portadores do Genótipo CC apresentaram menores valores de peptídeo C quando comparado aos demais genótipos (tabela 14).

Tabela 14: Frequência dos Genótipos do polimorfismo rs727088 do *CD226* em portadores de DM1A com até 2 anos de duração do diabetes e valores séricos de anticorpos anti-GAD, anti-IA2 e de peptídeo C

Variável	CC		TC +TT		P ^c
	n	Média±DP	n	Média±DP	
Anti-GAD	32	15,21 ± 18,3	70	9,61± 16,07	0,0331
Anti-IA2	32	12,43 ± 26,35	69	6,86± 8,57	0,4853
PepC	19	0,378± 0,29	42	0,7±0,516	0,0075

DP: desvio padrão; AntiGAD-65 (anticorpo antidescarboxilase do ácido -65 glutâmico; Anti IA2(anticorpo anti-tirosina fosfatase); PepC: peptídeo C; ^cteste de Mann Whitney; n= número de indivíduos, P corrigido pelo método de Bonferroni<0,0166 .

Quanto aos auto anticorpos extra pancreáticos, os genótipos não tiveram influência sobre a frequência dos mesmos. O alelo C apresentou maior frequência de autoanticorpos tireoideanos, mas esta significância não persistiu após correção por Bonferroni. Não houve influência do genótipo (tabela 15).

Tabela 15 : Frequência dos autoanticorpos extra pancreáticos segundo a variante rs727088 do CD226 nos pacientes diabéticos

Autoanticorpos	Genótipos		P	Alelos		P
	CC n (%)	TC+TT n (%)		C n (%)	T n (%)	
Anti-21OH						
Negativo	37(73,5)	103(26,5)		141(50,3)	139(49,7)	
Positivo	03(37,5)	05(62,5)	0,4463	10(62,5)	06(37,5)	0,4433
Célula Parietal						
Negativo	53(31,1)	117(68,9)		189(55,6)	151(44,4)	
Positivo	04(33,3)	08(66,7)	1,0000	13(54,1)	11(45,9)	1,0000
Musc Liso						
Negativo	61(32,1)	129 (67,9)		212(55,8)	168(44,2)	
Positivo	03(42,8)	04 (57,2)	0,6841	09(64,3)	05(35,7)	0,5939
FR						
Negativo	68 (34,7)	128 (65,3)		221(56,3)	171(43,7)	
Positivo	0	06 (100)	0,0992	05(41,6)	07(58,4)	0,3816
Anti endomísio						
Negativo	51 (33,7)	100 (62,3)		171(56,6)	131(43,4)	
Positivo	06 (54,5)	05 (45,5)	0,1967	14(63,6)	8(36,4)	0,6568
Anti LMK						
Negativo	32 (21,7)	115 (78,3)		191(57,2)	143(42,8)	
Positivo	0	04 (100)	0,5790	1(50,0)	1(50,0)	1,0000
ANCA						
Negativo	48 (32,6)	99 (67,4)		163(55,4)	131(44,6)	
Positivo	1 (25,0)	03 (75,0)	1,0000	05(62,5)	03(37,5)	1,0000
FAN						
Negativo	60 (33,7)	118 (66,3)		201(56,4)	155(43,6)	
Positivo	17 (31,5)	37 (68,5)	1,0000	52(53,0)	46(47,0)	0,6276
Anti TPO						
Negativo	61 (29,7)	144(70,3)		216(52,7)	194(47,3)	
Positivo	27 (41,5)	38 (58,5)	0,0947	82(63,0)	48(37,0)	0,0482
Anti Tg						
Negativo	61 (29,4)	146 (70,6)		219(52,9)	195(47,1)	
Positivo	28 (43,0)	37 (57,0)	0,0590	84(64,6)	46(35,4)	0,0248
TRAB						
Negativo	48 (34,3)	92 (65,7%)		159(56,7)	121(43,3)	
Positivo	05 (45,4)	06 (54,6%)	0,5181	14(63,6)	08(36,4)	0,6561

Anti-21-OH= anti-21 hidroxilase; anti -CP= anti- célula parietal; anti-ML= anti-músculo liso; FR=fator reumatóide; anti-LKM-1= anti-microssomal do fígado e rim; ANCA= anti-citoplasma do neutrófilo; FAN= anti-núcleo; anti-TPO= anti -tireoperoxidase; anti-Tg= anti-tireoglobulina; TRAB=anti-receptor do TSH; ^a teste exato de Fisher; ^bteste Qui quadrado; n= número de indivíduos; P crítico corrigido pelo método de Bonferroni<0,0045.

7.4.2.4 Análise das Variantes rs763361 e rs727088 estratificados pelo gênero (sexo masculino/feminino)

No sexo feminino, houve predomínio do genótipo AA da variante rs763361 e do genótipo CC da variante rs727088 nos diabéticos quando comparados com controles ($P=0,0012$ e $P=0,0071$, respectivamente). Já no sexo masculino, não houve diferença significativa na frequência das variantes nos dois grupos (tabelas 16 e 17).

Tabela 16: Frequência alélica e genotípica da variante rs763361 do *CD226* em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles estratificados pelo sexo

Variantes	DM1A	Controles		OR	IC	<i>P</i> ^b	DM1A	Controles		OR	IC	<i>P</i> ^b
	Feminio	Feminino	Masculino				Masculino					
	(n) (%)	(n) (%)	(n) (%)				(n) (%)					
rs763361												
Genótipo												
AA	111(35,1)	50 (21,9)	1,928	1,30 a	0,0012	67(31,2)	102(28,2)	1,154	0,79 a	0,504	1,66	
AG+GG	205(64,9)	178(78,1)				148(68,8)	260(71,8)					
Alelo												
A	360(57,0)	227(49,8)	1,335	1,04 a	0,0224	233(54,2)	386(53,3)	1,036	0,81 a	0,8213	1,31	
C	272(43,0)	229(50,2)				197(45,8)	338(46,7)					

^bTeste do Qui quadrado; OR = Odds ratio ; IC= Intervalo de Confiança; n= número de indivíduos; P corrigido pelo método de Bonferroni <0,025.

Tabela 17: Frequência alélica e genotípica da variante rs727088 do *CD226* em pacientes portadores de diabetes tipo 1A e controles estratificados pelo sexo

Variantes	DM1A	Controles				DM1A	Controles			
	Feminio	Feminino	OR	IC	P ^b	Masculino	Masculino	OR	IC	P ^b
	(n) (%)	(n) (%)				(n) (%)	(n) (%)			
rs727088										
Genótipo										
CC	102(32,5)	49 (21,6)	1,748	1,17 a	0,0071	64(29,9)	85(26,7)	1,175	0,80 a	0,4692
TC+TT	212(67,5)	178(78,4)		2,59		150(70,1)	234(73,3)		1,72	
Alelo										
C	347(55,2)	228(50,3)	1,224	0,96 a	0,1015	229(53,5)	340(53,3)	1,009	0,78 a	0,9954
T	281(44,8)	226(49,7)		1,55		199(46,5)	298(46,7)		1,28	

^bTeste do Qui quadrado; OR = Odds ratio ; IC= Intervalo de Confiança; n= número de indivíduos; P corrigido pelo método de Bonferroni <0,025.

7.4.3 Desequilíbrio de Ligação entre as variantes rs763361 e rs727088

Avaliamos a presença de desequilíbrio de ligação entre as variantes rs763361 e rs727088, localizadas no mesmo exon (7) e com manifestações fenotípicas comuns. Tanto nos diabéticos como nos controles, as duas variantes apresentaram forte desequilíbrio de ligação ($D' = -0,948$, $\chi^2 = 453,08$ e $D' = -0,97$, $\chi^2 = 508,18$, respectivamente).

O desequilíbrio de ligação para a variante rs1788101, no intron 5, e rs763361 também foi testado, mas estava presente apenas entre os diabéticos ($D' = -0,379$, $\chi^2 = 10,49$ DM1 e $D' = -0,263$, $\chi^2 = 5,01$).

7.5 Análise de Haplótipos (Frequência estimada)

A fase gamética dos haplótipos foi estimada através do programa PHASE (v.2.1.1), de acordo com um método bayesiano. Foram incluídos na análise polimorfismos identificados pelo seqüenciamento que apresentaram frequência acima de 5% (rs75418532A/G, rs1788101A/C, rs62090790C/T, rs72481820G/A, rs72481819G/A, rs763362T/C, rs763361A/G e

rs727088T/C). Uma lista com haplótipos rescontruídos foi gerada a partir de 08 variantes alélicas. Houve predomínio dos haplótipos AACGGTGT (6), AACGGCAC (2), ACCGGCAC (18), AACAGTAC (11) e AACGGTAC (5) que apresentaram distribuição semelhante entre os grupos ($P=0.32$) (tabela 18).

Tabela 18: Identificação, distribuição e frequência dos haplótipos estimados entre os grupos de diabéticos tipo 1A e controles

Identificação dos Haplótipos		n	DM1A n(%)	Controle n(%)
1	AACGGCAT	3.000000	02 (0,94)	01 (0,49)
2	AACGGCAC	100.000000	50 (23,6)	50 (24,5)
3	AACGGCGT	11.000000	09 (4,24)	02 (0,99)
4	AACGGTAT	7.000000	05 (2,36)	02 (0,99)
5	AACGGTAC	17.000000	10 (4,71)	07 (3,43)
6	AACGGTGT	148.000000	67 (31,6)	81 (39,7)
7	AACGGTGC	6.000000	03 (1,41)	03 (1,47)
8	AACGATGT	14.000000	03 (1,41)	11 (5,39)
9	AACAGCAC	2.000000	01 (0,47)	01 (0,49)
10	AACAGCGT	1.000000	01 (0,47)	00
11	AACAGTAC	27.000000	15 (7,07)	12 (5,94)
12	AACAGTGT	1.000000	01 (0,47)	00
13	AATGGCAC	9.000000	02 (0,94)	07 (3,46)
14	AATGGTGT	3.000000	01 (0,47)	02 (0,99)
15	AATGATGT	1.000000	01 (0,47)	00
16	AATAGTGT	1.000000	01 (0,47)	00
17	ACCGGCAT	2.000000	02 (0,94)	00
18	ACCGGCAC	28.000000	14 (6,60)	14 (6,93)
19	ACCGGTAC	13.000000	08 (3,77)	05 (2,45)
20	ACCGGTGT	6.000000	05 (2,36)	01 (0,49)
21	ACCGGTGC	3.000000	02 (0,94)	01 (0,49)
22	ACTGGCAC	3.000000	03 (1,41)	00
23	GACGGCAC	6.000000	02 (0,94)	04 (1,96)
24	GACGGTGT	2.000000	01 (0,47)	01 (0,49)
25	GACGATGT	1.000000	01 (0,47)	00
26	GCTGGTAT	1.000000	01 (0,47)	00

N=número de haplótipos.

Quando os grupos foram estratificados segundo a etnia, observou-se diferenças na distribuição dos haplótipos apenas entre pacientes DM1A e controles de etnia caucasóide ($P<0,0001$). Nos DM1A caucasóides predominaram os alelos dos haplótipos 5, 11, 18 e o agrupamento dos haplótipos raros do CD226 (tabela 19).

Tabela 19: Distribuição dos haplótipos entre os grupos de pacientes DM1A e controles caucasóides

Haplótipos	Controles Caucasóides n (%)	DM1A Caucasóides n (%)	Total n
11	6 (33)	12 (66)	18
18	10 (45)	12 (55)	22
2	40 (58)	29 (42)	69
5	5 (33)	10 (66)	15
6	72 (69)	32 (31)	104
8	7 (70)	3 (30)	10
raros	20 (31)	44 (69)	64

Raros: associação dos haplótipos de baixa frequência; n= número de indivíduos.

Já na avaliação dos haplótipos de diabéticos e controles não caucasóides, esta diferença não foi observada (tabela 20).

Tabela 20: Distribuição dos haplótipos entre os grupos de pacientes DM1A e controles não caucasóides

Haplótipos	Controles Não caucasóides n (%)	DM1A Não caucasóides n (%)	Total n
11	7 (77)	2 (23)	9
18	4 (66)	2 (33)	6
2	13 (42)	18 (58)	31
5	2 (100)	0 (00)	2
6	12 (60)	8 (40)	20
8	4 (100)	0 (00)	4
raros	10 (55)	8 (45)	18

Raros: associação dos haplótipos de baixa frequência; n=número de indivíduos.

7.5.1 Haplótipos formados pelas variantes rs763361 e rs727088

Após os resultados obtidos pela genotipagem e o forte desequilíbrio de ligação entre as variantes rs763361 e rs727088, optamos pela análise dos haplótipos formados por essas duas variantes, de susceptibilidade para o DM1A, com ênfase no haplótipo AC.

Houve predomínio do genótipo do haplótipo ACAC nos diabéticos quando comparado com os controles ($P=0,0137$) (tabela 21).

Tabela 21: Frequência do genótipo do haplótipo ACAC das variantes rs763361 e rs727088 do CD226 em pacientes diabéticos tipo 1A e controles

Genótipo do Haplótipo	DM1 n (%)	Controle n (%)	OR	IC	P
ACAC	161(30,5)	128(25,6)	1,419	1,082 a 1,861	0,0137
Outros	367(69,5)	414(76,4)			

Outros: AATC, AATT, AGTC, AGTT, AGCC, GGTT, GGTC e GGCC, OR=odds ratio, IC: intervalo de confiança; n= número de indivíduos.

As análises relacionando o genótipo do haplótipo ACAC com as características clínicas e laboratoriais nos pacientes diabéticos tipo 1A, foi semelhante à obtida com os genótipos de risco das variantes rs763361 e rs727088 (tabela 22). A frequência dos alelos do HLA-DR3/-DR4 não diferiram entre os genótipos dos haplótipos ($P=0,3203$).

Tabela 22: Frequência do genótipo do haplótipo ACAC das variantes rs763361 e rs727088 do *CD226* e características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de diabetes tipo 1A

Variável	ACAC		Outros		P
	n	%	n	%	
Etnia					
Caucasóides	126	30,0	293	70,0	0,2733
Não Caucasóide	35	36,5	61	63,5	
Sexo					
Masculino	61	28,5	153	71,5	0,4698
Feminino	100	31,8	214	68,2	
Idade de diagnóstico					
≤15 anos	104	29,0	254	71,0	0,2000
>15 anos	45	35,7	81	64,3	
Anti-GAD-65[†]					
presente	25	39	39	61	0,046
ausente	07	18,4	31	71,6	
Anti-IA2[†]					
presente	22	31,4	48	68,6	1,0000
ausente	10	32,2	21	67,8	
Pep C ng/mL[†]					
>0,5	06	18,2	27	71,8	0,0296
≤0,5	13	44,8	16	51,2	
HLA DR					
DR3 ou DR4	115	30,6	260	69,4	0,3203
DRx/DRx	17	24,3	53	75,7	

Outros: AATC, AATT, AGTC, AGTT, AGCC, GGTT, GGTC e GGCC; HbA1c=hemoglobina glicada; PepC=Peptídeo C; AntiGAD-65 (anticorpo antidescarboxilase do ácido -65 glutâmico; Anti IA2(anticorpo anti-tirosina fosfatase); [†]análise realizada em pacientes com até dois anos de duração do diabetes; DRx: não -DR3/-DR4; ^ateste exato de Fisher; ^bteste do Qui quadrado; n= número de indivíduos; P crítico corrigido pelo método do Bonferroni<0,007.

À semelhança dos resultados obtidos para as análises isoladas das variantes, os pacientes portadores do genótipo dos haplótipos ACAC apresentaram menores valores de peptídeo C quando comparados com o grupo controle (tabela 23).

Tabela 23: Frequência do genótipo do haplótipo ACAC dos polimorfismos rs763361 e rs727088 do *CD226* em portadores de DM1A com até 2 anos de duração do diabetes e valores séricos de anticorpos anti-GAD, anti-IA2 e de peptídeo C

Variável	ACAC		Outros		<i>P</i> ^c
	n	Média±DP	n	Média±DP	
Anti-GAD	32	15,21 ± 18,3	70	9,61± 16,07	0,0198
Anti-IA2	32	12,43 ± 26,35	69	6,86± 8,57	0,5860
PepC	19	0,378± 0,29	42	0,7±0,516	0,0075

Outros: AATC, AATT, AGTC, AGTT, AGCC, GGTT, GGTC e GGCC; DP: desvio padrão; AntiGAD-65 (anticorpo antidescarboxilase do ácido -65 glutâmico; Anti IA2(anticorpo anti- tirosina fosfatase); PepC: peptídeo C; ^cteste de Mann Whitney; n= número de indivíduos; P corrigido pelo método de Bonferroni<0,0166 .

Quanto à frequência de autoanticorpos extra pancreáticos, não houve diferença entre os haplótipos dos genótipos do *CD226* (tabela 24).

Tabela 24: Frequência dos autoanticorpos extra pancreáticos segundo o genótipo do haplótipos ACAC do CD226 nos pacientes diabéticos

Autoanticorpos	Genótipos		P
	ACAC n (%)	Outros n (%)	
Anti-21OH			
Negativo	36(25,7)	104(74,3)	0,4346 ^a
Positivo	03(3 7,5)	05(62,5)	
Célula Parietal			
Negativo	52(30,6)	118(69,4)	1,0000 ^a
Positivo	04(33,7)	08(66,6)	
Musc Liso			
Negativo	60(31,5)	130(68,5)	0,6821 ^a
Positivo	03(42,9)	04(57,1)	
FR			
Negativo	66(33,7)	130(66,3)	0,1803 ^a
Positivo	0	06(100)	
Anti endomísio			
Negativo	49(32,5)	102(67,5)	0,1863 ^a
Positivo	06(54,5)	05(45,5)	
Anti LMK			
Negativo	50(30,9)	112(69,1)	0,0964 ^a
Positivo	0	01(100)	
ANCA			
Negativo	46(31,3)	101(68,7)	1,0000 ^a
Positivo	1(25,0)	03(75,0)	
FAN			
Negativo	58(32,6)	120(67,4)	1,0000 ^a
Positivo	16(32,7)	33(67,3)	
Anti TPO			
Negativo	59(28,8)	146(71,2)	0,1226 ^b
Positivo	26(40,0)	39(60,0)	
Anti Tg			
Negativo	60(29,0)	147(71,0)	0,1302 ^b
Positivo	26(40,0)	39(60,0)	
TRAB			
Negativo	46(32,9)	94(67,1)	0,7317 ^a
Positivo	04(40,0)	06(60,0)	

Outros: AATC, AATT, AGTC, AGTT, AGCC, GGTT, GGTC e GGCC; Anti-21-OH= anti-21 hidroxilase; anti-CP= anti- célula parietal; anti-ML= anti-músculo liso; FR=fator reumatóide; anti-LKM-1= anti-microsomal do fígado e rim; ANCA= anti-citoplasma do neutrófilo; FAN= anti-núcleo; anti-TPO= anti -tireoperoxidase; anti-Tg= anti-tireoglobulina; TRAB=anti-receptor do TSH; ^a teste exato de Fisher; ^bteste Qui quadrado; n= número de indivíduos; P crítico corrigido pelo método de Bonferroni<0,0045.

7.6 Análise de Regressão Logística

A análise de regressão logística realizada para obtenção da OR ajustada para possíveis fatores de confusão demonstrou que o genótipo AA do rs763361 e GG do rs727088 permaneceram como fatores de risco independente para o diabetes tipo 1A quando comparados com outros fatores (tabela 25).

Tabela 25: Fatores associados ao diabetes tipo 1A em uma análise bivariada através da Análise de Regressão Logística Simples

Fatores	OR	IC	P
Etnia Caucasóide	2,69	2,04 - 3,55	< 0,001
Sexo M	0,42	0,33 - 0,54	< 0,001
Anti-GAD	57,76	28 - 119,13	< 0,001
Anti-GAD e Anti-IA2	200,9	27,9 - 1446,98	< 0,001
HLADR3/DR3	7,03	3,1 - 15,92	< 0,001
HLADR3/DR4	27,27	12,56 - 59,17	< 0,001
HLADR3/DRx	3,52	1,55 - 7,98	0,0013
HLADR4/DR4	1,42	1,06 - 1,91	0,0173
HLADR4/DRx	1,42	1,06 - 1,91	0,0173
Anti-IA2	38,79	20,69 - 72,72	< 0,001
ACAC	1,42	1,08 - 1,86	0,0113
Genótipo GG (rs727088)	1,41	1,08 - 1,84	0,0117
Genótipo AA (rs763361)	1,45	1,12 - 1,88	0,0044
PepC < 0,5 ng/dL	1405,58	340 - 5810,59	< 0,001

OR: Odds ratio; IC AntiGAD-65 (anticorpo antidescarboxilase do ácido -65 glutâmico; Anti IA2(anticorpo anti-tirosina fosfatase); Pep C= peptídeo C, DRx: não DR4/não DR3, ACAC: haplótipo do genótipo formado pelas variantes rs763361 e rs727088.

8- DISCUSSÃO

Diabetes tipo 1A é uma doença heterogênea caracterizada pela destruição das células β pancreáticas, culminando com deficiência absoluta de insulina. A maioria dos casos é atribuída a um processo de autoimunidade, resultante da interação de múltiplos fatores genéticos e ambientais¹.

Apesar das complexidades, o conhecimento dos fatores genéticos que modifiquem o risco de desenvolvimento do diabetes tipo 1A permite melhorar a predição da doença, estratificar pacientes susceptíveis e selecionar possíveis alvos terapêuticos. Inicialmente, estudos de *linkage* identificaram regiões do genoma (*loci*) contendo genes determinantes de susceptibilidade ao diabetes (IDDM). Atualmente, essas regiões são descobertas através de estudo de associação que avaliam genes candidatos. Esse tipo de estudo tem sido revolucionado por aqueles de rastreamento amplo do genoma, capazes de rastrear simultaneamente inúmeros genes, permitindo extensa avaliação do DNA. Qualquer alteração genética, polimorfismos, inserções, deleções ou repetições, não evoluem, na maioria das vezes, de maneira independente, permanecendo agrupadas e herdadas de geração para geração, servindo como marcadores para muitas outras alterações, o que permite a realização desse tipo de estudo^{28,31,33,86}.

Em 2007, um estudo de GWA associou um novo polimorfismo não sinónimo, rs766361, localizado na região cromossômica 18q22, ao risco de diabetes tipo 1A em uma população de descendência europeia. Este polimorfismo pertence ao gene *CD226*, responsável por codificar a molécula de adesão leucocitária, CD226⁶. Estudos posteriores relacionaram este mesmo polimorfismo com susceptibilidade para outras doenças autoimunes, como LES, esclerodermia, AR, tireoidite de Hashimoto, granulomatose de Wegener e doença celíaca^{12,76}.

A molécula do CD226 faz parte da superfamília das imunoglobulinas e está constitutivamente expressa na maioria dos linfócitos T CD4+ e CD8+,

células *natural killer*, monócitos, plaquetas e em um subgrupo de linfócitos B. A interação do CD226 com seus ligantes (CD155 e CD112) presentes em células específicas, induz citotoxicidade mediada por células NK e T CD8+ e secreção de citocinas. No processo de reconhecimento de antígenos através dos receptores de células T, o CD226 associa-se fisicamente à molécula de adesão α L β 2 integrina, LFA-1, participando dos sinais coestimulatórios para diferenciação de células T CD4+ virgens em células da linhagem Th1. Além disso, está envolvido no processo de ativação e adesão de macrófagos e plaquetas às células do endotélio vascular. Assim, o CD226 exerce funções importantes tanto para a imunidade inata quanto para a adaptativa^{10,11}.

O polimorfismo rs763361, localizado no exon 7 do gene do CD226, é responsável pela troca do aminoácido serina por glicina na posição 307 da proteína, região da cauda citoplasmática do CD226, onde se localizam os dois sítios de fosforilação (posição 322 e 329) importantes no processo de formação e transdução do sinal intracelular⁸¹. A consequência exata desta troca permanece por ser elucidada. Sugere-se que este polimorfismo ocasione uma ruptura em algum sítio de *splice* de transcrição ou silenciador, alterando o *splicing* do RNA, resultando em uma isoforma putativa do CD226 que poderia agir tanto como uma proteína não funcional ou com uma nova função, alterando a resposta dos linfócitos T^{13,71}.

Dieudé e cols, após confirmarem a associação do alelo A de risco da variante rs763361 em portadores de esclerodermia, investigaram as consequências da presença deste polimorfismo em indivíduos controles, analisando a expressão de proteína CD226 em diversos subtipos de células T. Não observaram diferença nos níveis de expressão proteica entre portadores do alelo selvagem ou polimórfico. Nesse mesmo estudo o genótipo de risco AA foi associado com alguns fenótipos de maior agressividade, principalmente, esclerodermia cutânea difusa, maior frequência do anticorpo anti-Topoisomerase-I e alveolite fibrosante⁷⁷. Recentemente, Löfgren e cols, avaliando pacientes com LES, observaram predomínio de um haplótipo de risco formado por três SNPs, rs763361-rs34794968-rs727088, localizados no exon 7 do *CD226*. Esses autores

demonstraram diminuição da expressão do gene *CD226* em células polimorfonucleares de indivíduos controles, homozigotos para esse haplótipo, assim como diminuição da expressão da proteína do *CD226* na superfície celular. A análise desses SNPs na região 3' *UTR* realizado em células HEK 293, sugeriu que o efeito funcional estava principalmente relacionado com a variante rs727088⁷⁹.

Contudo, apesar dos resultados previamente obtidos, o conhecimento sobre o envolvimento de outras variantes alélicas desse gene e suas influências na predisposição e fenótipo do DM1A é esparso. Em um único estudo realizado com pacientes diabéticos tipo 1A colombianos, Amit e cols não identificaram a variante rs763361 como de risco nesta população. Apesar do tamanho pequeno da amostra, o efeito da miscigenação da população pela mistura de ancestralidades pode ter afetado a distribuição do alelo de risco entre os indivíduos estudados, contribuindo para esse resultado⁸⁰.

Com o objetivo de aprimorar o conhecimento sobre o gene *CD226* e relacionar possíveis achados com susceptibilidade ao DM1A, 532 pacientes com diabetes tipo 1A e 594 controles foram envolvidos no presente estudo. Um subgrupo composto por 106 diabéticos tipo1A e 102 controles teve seu material genético, especificamente as regiões codificadoras e proximais do gene do *CD226*, avaliados através de PCR e sequenciamento. Três variantes, rs1788101, rs763361 e 727088, foram escolhidas para genotipagem, abrangendo um número maior de pacientes com DM1A e controles, contemplando a amostra final do estudo. A seleção das variantes foi baseada nos resultados obtidos a partir do seqüenciamento ou por relatos prévios da interferência destas na função do gene. A variante rs727088 presente na região 3' *UTR* do *CD226*, foi introduzida somente nesta etapa.

Clinicamente, e como esperado, o grupo dos diabéticos era constituído em sua maioria por indivíduos caucasianos, que apresentavam maior frequência e valores de autoanticorpos pancreáticos, menores níveis de peptídeo C e predomínio dos alelos HLA DR3/DR4, considerados de

risco para o desenvolvimento da doença, em relação aos controles. Os portadores de DM1A constituíram o grupo mais jovem, com idade média de diagnóstico da doença de 11,6 anos, compatível com os dados de outras populações¹. No grupo dos diabéticos os auto anticorpos, anti-21-OH, anti-CP, FAN, anti-TPO, anti-TG e TRAb foram significativamente mais frequentes que no grupo controle, confirmando a maior predisposição desta população para outras doenças autoimunes.

Quanto à análise do gene do CD226, a reação de PCR seguida por sequenciamento direto identificou 12 variantes alélicas previamente descritas em bancos de dados. Nenhuma variante nova foi encontrada. As frequências genotípicas, em diabéticos e controles estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg na maioria dessas variantes, com exceção da rs77826708, rs62090790, rs763362 e rs763361 nos pacientes diabéticos. Nesta primeira etapa houve predomínio do alelo C do polimorfismo rs1788101 A/C, posição -12 do íntron 5, nos pacientes portadores de DM1A quando comparados com os controles. Apesar desta diferença não persistir após correção por Bonferroni, a variante foi genotipada por ensaio *Taqman* em um grupo maior de diabéticos (n=421) e controles (n=415), com o intuito de definir seu papel na predisposição ao diabetes. O resultado final não mostrou associação da variante com a doença. Esse polimorfismo está localizado em uma área próxima a sítio de *splice*, mas não interfere com o mesmo.

Quanto ao polimorfismo rs763361 A/G, localizado no exon 7, o genótipo AA foi mais frequente em portadores de DM1A. Diabéticos de diagnóstico recente, com este genótipo, apresentaram menores níveis de peptídeo C quando comparados com os diabéticos sem este genótipo (AG ou GG). Este achado corrobora seu papel na predisposição ao diabetes e pode, inclusive, indicar maior gravidade do processo de destruição das células β . A análise dos valores séricos de peptídeo C e autoanticorpos pancreáticos, no grupo de diabéticos, foi feita apenas nos pacientes com até dois anos de duração da doença, considerando que a produção de peptídeo C praticamente não ocorre após este tempo, caindo drasticamente no primeiro ano do diagnóstico⁸⁷. O mesmo ocorre os autoanticorpos

pancreáticos que tendem a desaparecer com o tempo, à exceção do anti-GAD que pode persistir após muitos anos do diagnóstico⁴⁰. Contrariando estudos nos quais outras doenças autoimunes estavam relacionadas ao alelo A e genótipo AA, não evidenciamos diferença na frequência de autoanticorpos pancreáticos e extrapancreáticos nos diabéticos com o genótipo de risco. É importante destacar que a variante, rs763361, não estava em equilíbrio de Hardy Weinberg nos pacientes com diabetes, apesar de não desviar na população geral e nos controles, o que pode indicar uma verdadeira associação entre a variante e a doença. Em paralelo, a frequência do alelo A foi semelhante à de outras populações de diabéticos estudadas¹³.

Quanto à variante rs727088, a análise estatística mostrou associação do genótipo CC com o diabetes tipo 1A e com menores valores de peptídeo C neste grupo. Além disso, esta variante estava em forte desequilíbrio de ligação com a variante rs763361. No entanto o rs727088 não estava em equilíbrio de Hardy Weinberg na população de controles, suscitando dúvidas quanto aos achados. A probabilidade de que o desvio no equilíbrio possa ter ocorrido por erros no processo de genotipagem é questionável, principalmente se for considerado o excesso de heterozigotos obtidos, o que contraria o efeito de alelo *drop out*, um dos principais responsáveis por alterar os resultados do ensaio. Uma hipótese plausível para este achado seria a estratificação da população, ou seja, populações com frequências alélicas diferentes para uma determinada característica, misturadas em uma mesma análise. A população brasileira é sabidamente heterogênea quanto à etnia, a qual pode ser responsável pelas diferentes frequências alélicas em subpopulações distintas, mas a falta de uma análise genética específica para determinar ancestralidade não nos permite inferir que as alterações encontradas neste estudo sejam devidas a este fator. Outro achado sugestivo do efeito da estratificação nos resultados refere-se à distribuição dos haplótipos estimados, diferente entre os grupos após estratificação por etnia, mas semelhante no grupo total⁸⁸.

O desequilíbrio de ligação entre dois polimorfismos sugere que a susceptibilidade a uma determinada doença, assim como a sua expressão gênica, não sejam relacionados a uma só variante. Neste estudo, o rs763361 e o rs727088 estavam em desequilíbrio de ligação, tanto nos diabéticos como nos controles. O genótipo do haplótipo ACAC formado por esses, além de predominar no grupo de diabéticos, também foi associado a menores níveis de peptídeo C, relacionando essas duas variantes com o um mesmo efeito no fenótipo. Nesse estudo tanto o alelo A, do rs763361, quanto o alelo C do rs727088, só contribuíram com o risco de diabetes tipo 1A quando em homozigose, sendo o efeito de perda de função ou haploinsuficiência uma hipótese para esse achado.

Na nossa população, quando estratificados por gênero, as freqüência dos genótipos de risco AA e GG foram significativamente maiores nas mulheres com diabetes tipo 1A quando comparadas com controles femininos. Em geral, as doenças autoimunes predominam no sexo feminino e podem ser atribuídas à influência hormonal, microquimerismo fetal e inativação ou anormalidades no cromossomo X. Níveis elevados de estrogênio e progesterona supostamente induzem a resposta imunológica via Th2 (humoral) e baixos níveis, estimulam a via Th1 (celular). O tratamento com estrogênio parece proteger os linfócitos B do processo de apoptose alterando a sobrevivência e ativação dos mesmos o que poderia alterar o sistema imune inato induzindo autoimunidade e proliferação celular. Este fato sugere que os hormônios, especificamente os femininos, possam afetar diretamente o sistema imunológico, potencializando ou atenuando alterações existentes⁸⁹. À semelhança de dados epidemiológicos de regiões onde a incidência de diabetes tipo 1A é baixa e de acordo com dados prévios da população local de São Paulo^{15,90}, o número de mulheres acometidas foi maior quando comparado com o dos homens, sugerindo o papel destes polimorfismos na predisposição ao DM1A no sexo feminino. Cucca e cols atribuíram a diferença de incidência entre os sexos à maior ou menor freqüência do genótipo DR3/DRX (outro alelo que não o DR3 ou DR4) e sua ligação com a região cromossômica Xp13-p11. Isto sugere que a

predileção por um determinado gênero possa decorrer da distribuição dos alelos HLA nas diferentes populações⁹¹.

Assim, corroborando com dados prévios da literatura, a variante rs763361 do gene *CD226* foi associada à predisposição ao diabetes tipo 1 autoimune em uma coorte brasileira, e a agressividade da doença. O rs727088, apesar de também estar relacionado à susceptibilidade ao diabetes, não estava em equilíbrio de Hardy Weinberg nos controles, devendo ser analisado com cautela, assim como os resultados para o genótipo do haplótipo. Maior efeito do rs763361 foi visto no grupo das mulheres com DM1A o que pode ter sido influenciado por outros fatores, como o HLA e hormônios sexuais. Devido à heterogeneidade da população, o efeito do alelo de risco pode ter sido atenuado, conferindo risco apenas em homozigose, sendo, nossa amostragem, talvez insuficiente para relacioná-lo com outros aspectos de autoimunidade.

Apesar desses achados, novos estudos relacionando o efeito dessas variantes segundo a ancestralidade poderão confirmar o risco por elas conferido, independente da heterogeneidade populacional.

9- Conclusão

No presente estudo o genótipo AA da variante rs763361 do gene *CD226* e o genótipo CC da rs727088 foram associadas à susceptibilidade ao diabetes tipo 1 autoimune, porém esta última não estava em equilíbrio de Hardy Weinberg nos controles. Esses dois genótipos e o genótipo do haplótipo formado por esses, relacionaram-se com menores valores de Peptídeo C, conferindo maior agressividade à doença. As variantes não influenciaram na frequência de autoanticorpos pancreáticos e extra pancreáticos. Quando estratificados para o gênero, os genótipos tiveram efeito significativo na predisposição ao DM1A apenas no sexo feminino. O risco conferido pelos genótipos AA do rs763361 e GG do rs727088 foram independentes de outros fatores de susceptibilidade para DM 1A.

10- ANEXO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/06/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0126/08**, intitulado: **"ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DO GENE CD226 À SUSCEPTIBILIDADE AO DIABETES MELITUS TIPO 1 AUTOIMUNE"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

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

Pesquisador (a) Responsável: **DRA MARIA ELIZABETH ROSSI DA SILVA**

Pesquisador (a) Executante: **DRA TERESA CRISTINA COLVARA MATTANA**

CAPPesq, 06 de Junho de 2008

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

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2010; 39(2010): 481-497.
- 2-Pugliese A, Eisenbarth GS. Type 1 Diabetes Mellitus of Man: Genetic Susceptibility and Resistance. Eisenbarth, G.S.(Ed). *Immunology of Type 1 Diabetes*. New York: Kluwer Academic; 2004. p.170-203.
- 3-Eisenbarth GS & Lafferty K.Type 1 diabetes: Cellular, Molecular and Clinical Immunology. <http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/books.html>
- 4-Lira R, Cavalcanti N. *Diabetes Mellitus*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Diagraphic; 2006. Cap.6-7, p.71-86.
- 5-Larsen P P, Kronenberg H M, Melmet S, Polonsky K S, Foster D W, Wilson J D. *Williams Textbook of Endocrinology*. 11th ed: Saunders, 2008. cap31:1391-1401.
- 6-Todd A John, Walker N M, Cooper J D, Smyth D J, Downes K, Plagnol V, Bailey R, et al. Robust Associations of Four New Chromosome Regions from Genome-Wide analyses of Type 1 Diabetes. *Nat genet*. 2007. 7 (39):857-864.
- 7-Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Onoda Y, Zhang H, Yamazaki S, Miyamoto A, Honda S, Lanier LL, Shibuya A. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) and interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int Immunol*, 2004 jan; 16 (4): 533-538.
- 8-Shibuya K, Shirakawa J, Kameyama T, Honda S, Tahara-Hanaoka S, Miyamoto A, Onodera M, Sumida T, Nakauchi H, Miyoshi H, Shibuya A. CD226 (DNAM-1) Is Involved in Lymphocyte Function-associated Antigen 1 Costimulatory Signal for Naive T cell Differentiation and Proliferation. *J. Exp. Med*. 2003 dec, 15 (198): 1829-1839.
- 9-Dardalhon V, Schubart A S, Reddy J, Meyers J H, Monney L, Sabatoss C A, Ahuja R, Nguyen K, Fremman G J, Greenfield E A, Sobel R A, Kuchroo V K. CD226 Is Specifically Expressed on The Surface of Th1 Cells and Regulates Their Expansion and Effector Functions. *J. Immunol*. 2005, 175:1558-1565.

- 10**-Shibuya A, Campbel D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McCianahan T, Kitamura T, Nichoil J Sutherland G R, Lanier L L, Phillips J.H. DNAM-1 A Novel Adhesion Molecule Involved in Cytolytic Function of T-Lymphocytes. *Immunity*. 1996, 4, 573-581.
- 11**-Shibuya A, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K. DNAM-1 (CD226): A Two-Sword Fencer for Innate and Adaptative Immunity. *Curr Med Chem*. 2005; 4 (1): 53-58.
- 12**-Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, Stevens HE, Walker NM, Healy B, Howson JM, Maisuria M, Duley S, Coleman G, Gough SC; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Worthington J, Kuchroo VK, Wicker LS, Todd JA. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immunity*. 2009; 10(1):5-10.
- 13**-Douroudis K, Nemvalts V, Rajasalu T, Kisand K, Uibo R. The CD226 gene in susceptibility of type 1 diabetes. *Tissue Antigens*. 2009; 74:417-419.
- 14**-American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2011; 34 (1):62-69.
- 15**-Negrato CA, Dias JP, Teixeira MF, Dias A, Salgado MH, Lauris JR, et al. Temporal trends in incidence of Type 1 diabetes between 1986 and 2006 in Brazil. *J Endocrinol Invest*, 2010;33(6):373-377.
- 16**-Lisboa HR, Graeben R, Butzke L, Rodrigues CS. Incidence of Type 1 diabetes mellitus in Passo Fundo, RS, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1996; 36 (12):1553-1556.
- 17**-Green A, Gale EAM, Patterson CC. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus: the EURODIAB ACE Study. *Lancet*. 1992; 339:905-909.
- 18**- Karvonem M, Pitkaniemi M, Pitkaniemi J, et al. Sex difference in the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus:an analysis of the recent epidemiological data. World Health Organization DIAMOND Project group. *Diabetes Metab Rev*, 1997;13:275-291.
- 19**-Gianini R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes: 2005. *Immunol Rev*, 2005; 204: 232-249.

- 20**-Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL. Mediators and Mechanism of Pancreatic Beta-cell Death in Type 1 Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008; 2 (52): 156-163.
- 21**-Aly TA, Ide A, Jahromi MM, Barker JM, Fernando MS, Babu SR, Yu L, Miao D, Erlich HA, Fain PR, Barriga KJ, Norris JM, Rewers MJ, Eisenbarth GS. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *PNAS.* 2006 set, 38 (103):1474-1479.
- 22**-Eisenbarth GS, Jeffrey J. The Natural History of Type 1A Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008; 2 (52):146-153.
- 23**-Kulmala P, Savola K, Petersen JS, et al. Prediction of insulin-dependent diabetes mellitus in siblings of children with diabetes: a population-based study. The Childhood Diabetes Finland Study Group. *J Clin Invest,* 1998; 101: 327-336.
- 24**- Pihoker C, Gilliam LH, Hampe CS, Lenmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes,* 2005;54 (Suppl 1):S52-S61
- 25**-Bloomgarden Z T. Immunologic Issues in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2001; 12 (24): 2143-2148.
- 26**-Achenbach P, Warncke K, Reiter J, et al. Stratification of type 1 diabetes risk on the basis of islet autoantibodies characteristics. *Diabetes.* 2004; 53: 384-392.
- 27**-Barker JM. Clinical review: type 1 diabetes -associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. *J Clin Endocrinol Metab,* 2006; 91 (4): 1210-1217.
- 28**-Nosikov VV, Seregin YA. Molecular Genetics of Type 1 Diabetes Mellitus: Achievements and Future Trends. *Molecular Biology.* 2008; 5 (42): 773-783.
- 29**-Eisenbarth GS. Update in Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab,* 2007 92(7):2403-2407.
- 30**-Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Akerblom HK. Environmental Triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005; 54 (2): 125-136.
- 31**-Maier LM, Hafler DA. Autoimmunity risk alleles in costimulation pathways. *Immunol Rev.* 2009; 229:322-336.

- 32**-Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmunity and allergic diseases. *N Engl J Med*, 2002; 347: 911-920.
- 33**-Wiebolt J, Koeleman BPC, Van Haeflen TW. Endocrine autoimmune disease: genetics become complex. *Eur J of Clin Invest*. 2010; 111 (10):1-10.
- 34**-Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, et al. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med*. 2008; 359: 2849-2850.
- 35**-Hemminki K, LiX, Sundquist J, et al. Familial association between type 1 diabetes and other autoimmune and related diseases. *Diabetologia*, 2009;52:1820-1828.
- 36**-Tood J A, Bell J, McDevitt H. DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to IDDM. *Nature*. 1987; 329:599-604.
- 37**-Khalil I, d'Aurio L, Gobet M, et al. A combination of HLA-DQ β Asp57-negative and HLA-DQ α Arg52 confers susceptibility to type 1 diabetes in Russian patients. *Acta Diabetologica*. 1990; 85: 1315-1319.]
- 38**-Achenbach P, Bonifacio E, Koczwara K, Ziegler AG. Natural History of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2005; 2(54):25-31.
- 39**-Silva MER, Mory D, Davini E. Marcadores Genéticos e Auto-Imunes do Diabetes Melito Tipo1: da Teoria para a Prática. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008, 2 (52):166-180.
- 40**-Davini E, Silva MER, Alves LI, Correa M, Fukui R, Latrônico AC, et al. O genótipo I/I do locus VNTR do gene da insulina confere risco independente para o diabetes mellitus tipo 1 nos pacientes sem os genótipos DRB1 e DQB1 de susceptibilidade. *Arq Bras Endocrinol e Metab*, 2005; 51:545-541.
- 41**-Alves C, Meyer I, Vieira N, Toralles MBP, LeMaire D. Distribuição e frequência de alelos e haplótipos HLA em brasileiros com diabetes melito tipo 1. *Arq Bras Endocrinol e Metab*. 2006; 50 (3): 436-444.
- 42**-Bonifacio E, Ziegler AG. Advances in Prediction and Natural History of Type 1 Diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2010; 39(2010):513-525.
- 43**-Yu J, Yu L, Bugawan TL, Erlich HA, Barriga K, Hoffma M, Rewers M, Eisenbarth GS: Transient antiislet autoantibodies: infrequent occurrence and lack of association with genetic risk factors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000;

85:2421-2428.

44-Schenker M, Hummel M, Ferber K, Walter M, Keller E, Albert ED, Janka HU, Kastendiek C, Sorger M, Louwen F, Ziegler AG: Early expression and high prevalence of islet autoantibodies for DR3/4 heterozygous and DR4/4 homozygous offspring of parents with type I diabetes: the German BABYDIAB study. *Diabetologia*. 1999; 42 :671 –677.

45-Mainardi-Novo DTO, Gamberini M, Longhi MT, Alves LI, Queiroz MS, Fukui RT, et al. Non Islet autoantibodies (non-tAAb): prevalence and association with PTPN22 1858T in Brazilian Type 1 Diabetes Mellitus (DM1) Patients. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2007; Supl1:S103.

46-JDRF Request For Applications: Common Mechanism of Autoimmune Disease. 2007 jun.

47-Csorba TR, Lyon AW, Hollenberg MD. Autoimmunity and the pathogenesis of type 1 diabetes. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2010; 47(2): 51-71.

48-Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia Molecular e Celular*. 5ed.Rio de Janeiro:Elsevier; 2005. Apêndice II, p.523.

49-Fauci A S, Brawnwald E, Isselbacher K J, Wilson D, Martin J B, Kasper D L, Hauser S L, Longo D L. *Harrison's: Principles of Internal Medicine*. 14 ed. McGraw-Hill Companies; 1998; cap12: 1753-1776.

50-Bilate AMB. Inflamação, proteínas da fase aguda, citocinas e quimiocinas. *Temas de Reumatologia Clínica*. 2007;8 (3):86-90.

51-Lehuen A, Diana J, Zacccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev*, 2010; 10:501-510.

52-Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocr Rev*, 2007; 28:492-520.

53-Mordes JP, Bortell R, Blankenhorn EP, Rossini AA, Greiner DL. Rat models of type 1 diabetes: genetics, enviroment, and autoimmunity. *ILAR J*. 2004; 45:278-291.

54-Ballotti S, Chiarelli F, Martino M. Autoimmunity: Basic Mechanism and Implications in Endocrine Diseases: Part I. *Horm Res*. 2006; 66: 132-141.

55-Ballotti S, Chiarelli F, Martino M. Autoimmunity: Basic Mechanism and

Implications in Endocrine Diseases: Part II. *Horm Res*, 2006, 66:142-152.

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

57-Ott PA, Anderson MR, Tary-Lehmann M, Lehmann PV: CD4+CD25+ regulatory T cells control the progression from periinsulinitis to destructive insulinitis in murine autoimmune diabetes. *Cell Immunol* 2005; 235:1–11.

58-Crisóstomo L.G., Fores, J.P., Silva, M.E.R. - Joint meet -2009 - Hormone Research PO1 – 351 Type 1 Diabetes).

59-Dianzani U, Chiocchetti A, Ramenghi U: Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sci*.2003;72:2803–2824.

60-Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, et al: Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*. 1995; 81:935–946.

61-Hugues S, Mougneau E, Ferlin W, Jeske D, Hofman P, Homann D, Beaudoin L, Schrike C, Von Herrat M, Lehuen A, Glaichenhaus N: Tolerance to islet antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic β cells. *Immunity*. 2002; 16:169–181.

62- Angelini F, Del Duca E, Piccinini S, Pacciani V, Rossi P, Manca Bitti ML: Altered phenotype and function of dendritic cells in children with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:341–346.

63-Lutz MB, Schuler G: Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23:445–449.

64-Nikolic T, Bunk M, Drexhage HA, Leenen PJM: Bone marrow precursor of nonobese diabetic mice develop into defective macrophage-like dendritic cells in vitro. *J Immunol* 2004;173:4342–4351.

65-Rodacki M, Milech A, Oliveira JE. NK cells and type 1 diabetes. *Clin Develop Immunol*. 2006; 13:101-107.

66-Wong FS, Wen L, Tang M, Ramanathan M, Visintin I, Daugherty J, Hannum LG, Janeway CA, Shlomchik MJ: Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetes*, 2004; 53:2581–2587.

67-Falcone M, Lee J, Patstone G, Yeung B, Sarvetnick N: B lymphocytes are

crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice. *J Immunol*, 1998; 161:1163–1168.

68-Shibuya K, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Shibuya A. Comment on “CD226 Is Specifically Expressed on the Surface of Th1 Cells and Regulates Their Expansion and Effector Functions”. *J. Immunol.* 2006; 176:3855-3856.

69-Bierer BE, Sieckmann BP, Ratnofsky, Burakoff SJ. The biological roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.*, 1989;7:579-599.

70-Sherrington PD, Scott JL, Jin B, Simmons D, Dorahy DJ, Lloyd J, Brien JH, Aebersold RH, Adamson J, Zuzel M, Burns FG. TliSA1 (PTA1) Activation Antigen Implicated in T Cell Differentiation and Platelet Activation Is Member of the Immunoglobulin Superfamily Exhibiting Distinctive Regulation Expression. *J Biol Chem*, 1997; 272 (35): 21735-21744.

71-International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. The expanding genetic overlap between multiple sclerosis and type 1 diabetes. *Genes and Immunity*. 2008; 1 (4):11-14.

72-Shirakawa J, Wang Y, Tahara-Hanaoka S, Honda S, Shibuya K, Shibuya A. LFA-1-dependent lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226) in CD4+ T cell. *Int Immunol*. 2005; 18 (6): 951-957.

73-Bryceson Y. T.; March, M. E.; Ljunggren, H.G.; Long, E.O. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*. 2006 jan; 107 (1): 159-166.

74-Gilfillan S, Chan CJ, Cella M, Haynes NM, Rapaport A S, Boles KS, Andrews DM, Smyth MJ, Colonna M. DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med*, 2008 dez; 205 (13):2965-2973.

75-Chen L, Xie X, Zhang X, Jia W, Jian J, Song C, Jin B. The expression, regulation and adhesion function of a novel CD molecule, CD226, on human endothelial cells. *Life Sci*. 2003; 18 (73):2373-2382.

76-Maiti AK, Kim-Howard X, Viswanathan P, Guillén L, Qian X, Rojas-Villarraga A, Sun C, Cañas C, Tobón GJ, Matsuda K, Shen N, Cherniavsky

AC, Anaya JM, Nath S. Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatology*. 2010;10 (1093):1-6.

77-Dieudé P, Guedj M, Truchetet ME, Wipff J, Revillod L, Riemekasten G, Matucci-Cerinic M, Melchers I, Hachulla E, Airo P, Diot E, Hunzelmann N, Mouthon L, Cabane J, Cracowski JL, Riccieri V, Distler J, Amoura Z, Valentini G, Camaraschi P, Tarner I, Frances C, Carpentier P, Brembilla NC, Meyer O, Kahan A, Chizzolini C, Boileau C, Allarore Y. Association of the CD226 Ser307 Variant With Systemic Sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2011; 63 (4): 1097-1105.

78-Doudoudis K, Kingo K, Slim H, Reimann E, Traks T, Vasar E, Kõks S. The CD226 Gly307Ser gene polymorphism is associated with severity of psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2010; 58 (2):160-161.

79-Löfgren SE, Delgado-Vega AM, Gallant CJ, Sánchez E, Frostegård J, Truedsson L, de Ramón Garrido E, Sabio JM, González-Escribano MF, Pons-Estel BA, D'Alfonso S, Witte T, Lauwerys BR, Endreffy E, Kovács L, Vasconcelos C, Martins da Silva B, Martín J, Alarcón-Riquelme ME, Kozyrev SV. A 3'UTR Variant Is Associated with Impaired Expression of CD226 in T and NK T Cells and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheum*. 2010; 62(11):3404-3414.

80-Maiti AK, Kim-Howard X, Viswanathan P, Guillén L, Qian X, Rojas-Villarraga A, Sun Celi, et al. Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatology*. 2010; 49(7):1239-1244.

81-Shirakawa J, Shibuya K, Shibuya A. Requirement of the serine at residue 329 for lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226). *Int Immunol*. 2005; 17 (3): 217-223.

82-DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabet Med*. 2006; 23:857-866.

83-Karvonen M, Viik-Kajander M, Moltchanova E, et al. Incidence of childhood Type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care*. 2000; 23:1516-1526.

- 84**-Dellavance A, Junior AG, Nuccitelli B, Taliberti B H, Von Mühlen CA, Bichara CDA, et al. 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. *Rev Bras Reumatol*, 2009; 49(2):89-109.
- 85**-Freitas IN, Sipahi AM, Damião AOMC, Brito T, Cançado ELR, Leser PG, et al. Celiac Disease in Brazilian Adults. *J Clin Gastroenterol*. 2002; 34 (4):430-434.
- 86**-Stephen S, Nepom GT. Genetics of Type 1A Diabetes. *N Engl J Med*, 2009; 306 (16):1646-1654.
- 87**-Palmer JP. C-peptide in natural history of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009; 25: 325-328.
- 88**-Ryckman K, Williams SM. Calculation and Use of the Hardy-Weinberg Model in Association Studies. *Current Protocols in Human Genetics*. 2008; 57 (Suppl1.18): 1-11.
- 89**-Cutolo M, Sulli A, Straub RH. Estrogen metabolism and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 2012; 11:460-464.
- 90**-Ferreira RS, Franco LJ, Vivolo MA, Negrato CA, Simoes AC, Venturi CR. Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. *Diabetes Care*. 1993;16(5):701-704.
- 91**-Cucca F, Goy VJ, Kawaguchi Y, Esposito L, Merriman ME, Wilson AJ, et al. Male-female bias in type 1 diabetes and linkage to chromosome Xp in MHC HLA-DR3-positive patients. *Nat Genet*. 1998; 19: 301-302.