VINÍCIUS SILVA COSTA

**Associação do gene *IL23A* com a proteção 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 CoPGr 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

Costa, Vinícius Silva

Associação do gene *IL23A* com a proteção ao diabetes mellitus tipo 1 autoimune /
Vinícius Silva Costa. -- São Paulo, 2012.

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

Orientador: Maria Elizabeth Rossi da Silva.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1 2.Sistema imunológico 3.Interleucina-23

USP/FM/DBD-160/12

Este Trabalho foi desenvolvido no
Laboratório de Carboidratos e
Radioimunoensaio (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

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que permitiu que eu finalizasse mais esta etapa .

Dedico também aos meus Pais (Pedro e Isabela), Irmãos, à minha esposa Vivianne e aos meus filhos amados Davi e Daniel que compreenderam os momentos de ausência e me deram todo suporte.

Uma dedicatória especial ao meu filho Davi que, recentemente, passou por uma situação de adversidade na qual nos mostrou o quanto ele é forte e compreensivo. Foi um momento de muita emoção para toda nossa Família que, Graças a Deus, passou.

Agradeço aos meus Pais e esposa (Vivianne) que me incentivaram nas horas difíceis e me estimularam a vencer as barreiras durante todos estes quatro anos.

Agradeço à minha orientadora Dra Maria Elizabeth Rossi da Silva, primeiramente por ter me aceitado como orientando, por ter me dado todas as ferramentas para elaboração do Projeto e meu engrandecimento profissional, sempre procurando demonstrar equilíbrio e ao, mesmo tempo, a firmeza necessária. A Dra Maria Elizabeth trata com muito carinho seus alunos e a terei por toda minha vida como exemplo profissional e de pessoa humana.

Agradeço à minha Amiga Aritânia, sem a qual dificilmente teria tido êxito no meu trabalho. Que Deus a abençoe cada vez mais e permita que possamos nos encontrar sempre.

Agradeço à minha Amiga e colega médica Teresa, também sempre muito prestativa.

Agradeço a todos os funcionários e médicos do LIM-18 que me acolheram com muito carinho e atenção.

Agradeço aos pacientes do Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Anexos

Resumo

Summary

1.0-Introdução	1
1.1- Fatores ambientais	1
1.2- Patogênese do Diabetes tipo 1	3
1.2.1-Imunidade celular	3
1.2.2-Imunidade Humoral	4
1.2.3-Genética do Diabetes tipo 1 A	6
1.2.4-MHC-Complexo Maior de Histocompatibilidade	7
1.3-Via de ativação da viaTh17pela IL-23	10
1.4-Estrutura da IL-23	14
1.5-IL-23 na imunidade inata e adaptativa	15
1.6-Eixo IL-17/IL-23 no DM1A e outras doenças	16
1.6.1-Diabetes tipo 1 A	16
1.6.2-Outras doenças autoimunes	18
2.0-Justificativa do Estudo	21
3.0-Objetivos	22
4.0-Material e Métodos	23
4.1-Considerações éticas	23
4.2-Casuística	23
4.2.1-Pacientes	23
4.2.2-Controles	24

4.3-Reação cadeia de polimerase(PCR)	24
4.4-Sequenciamento automático	27
4.5-Ensaio de Genotipagem pelo Taq Man	28
4.6-Avaliação bioquímica	29
4.6.1-Glicemia	29
4.6.2-Hemoglobina glicada	29
4.6.3-Auto anticorpos pancreáticos	30
4.6.4-Auto anticorpos extrapancreáticos	31
4.6.5-IL-23	32
4.7-Análise estatística	33
5.0-Resultados	34
5.1-Sequenciamento do gene <i>IL23A</i>	35
5.2-Polimorfismos rs1171809 e rs2066808 do gene <i>IL23A</i>	37
5.3-Frequência dos Haplótipos (rs2066808 e rs1171806) do gene <i>IL23A</i>	39
5.4-Variantes rs11209026 e rs10889677 do gene <i>IL-23R</i>	40
5.5-Concentrações da IL-23 no grupo de pacientes DM1A e controles	40
5.6-Efeitos do Haplótipo GG das variantes do gene <i>IL-23A</i> rs2066808 e rs11771806 nas variáveis laboratoriais	42
6.0-Discussão	44
7.0-Conclusões	49
8.0-Anexos	50
9.0-Referências	53

Lista de Abreviaturas

A	Adenina
Anti-21OH	anti-21 Hidroxilase
Anti-endom	anti-endomísio
ANCA	anti-citoplasma de neutrófilo
Anti-TG	anti-tireoglobulina
Anti-TPO	anti-tireoperoxidase
APCs	células apresentadoras de antígenos
Arg	Arginina
C	Citosina
CCR6	<i>“chemokine (C-C motif) receptor 6”</i>
CTLA-4	antígeno 4 associado ao Linfócito T citotóxico
DM1A	diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 A
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DP	desvio padrão
EDTA	ácido diaminoetanotetracético
FAN	fator anti-núcleo
FOXP3	fator de transcrição <i>forkhead box p3</i>
FR	fator reumatoide
G	Guanina
GAD65	enzima descarboxilase do ácido glutâmico
GATA 3	fator de transcrição ligado a proteína 3

GM-CSF	fator estimulador de colônia de Macrófagos
gp130	glicoproteína transdutora do sinal de 130 kDa
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 Langherhans citoplasmático
IDDM1	<i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 1</i>
IDDM2	<i>Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 2</i>
IFN	Interferon
IFI	Imunofluorescência Indireta
IL	Interleucina
INS	Insulina
JAK	<i>“Janus Kinase”</i>
LES	Lupus eritematoso sistêmico
Lyp	proteína linfóide tirosina fosfatase
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
NK	células exterminadoras <i>“natural killer”</i>
NO	óxido nítrico.

NOD	Linhagem de camundongo não obeso diabético
OR	Razão de chances, do inglês “ <i>odds ratio</i> ”
p40	subunidade da Intereucina 12 e 23
P19	subunidade da interleucina 23
Pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
Pep C	Peptídeo C
Pd	Padrão de massa
<i>Primer F</i>	iniciadores sense (Forward)
<i>Primer R</i>	iniciadores antisense (Reverse)
RR	Risco relativo
ROR γ t	<i>t retinoid related orphan receptor-gamma gama</i>
SNP	“ <i>single nucleotide polymorphism</i> ”
STAT	“ <i>signal transduction amplification Tirosine</i> ”
T	Timina
Tbet	“ <i>T Box Express in T cells</i> ”
TLR	“ <i>Toll like receptor</i> ”
Th	Linfócitos T helper
Treg	Linfócitos T reguladores
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF	Fator de crescimento transformador
χ^2	Qui-quadrado
ZnT 8	Transportador de Zinco 8

Lista de Símbolos

β	beta
α	alfa
γ	gama
=	igual
>	maior
<	menor
$\leq$	menor igual
$\pm$	mais ou menos
%	percentagem
N	número
μL	microlitro
mL	mililitro
ng	nanograma
ng/ μL	nanograma/microlitro
mg/dL	miligramas/decilitro
mg/mL	miligramas/mililitro
U/ μL	unidade/microlitro
U/mL	unidade/mililitro
nU/mL	nanounidades/mililitro
M	molar
mM	milimol
pMol	picomol
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Na	Sódio
I ¹²⁵	iodo 125
KDa	kilodaltons
°C	grau Celsius

Tabela 1. Oligonucleotídeos selecionados para amplificação do gene <i>IL-23A</i>	26
Tabela 2. Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com diabetes tipo 1 A e controles normais	35
Tabela 3. Frequências genotípicas das variantes nas regiões codificadoras e 5'proximal do gene <i>IL23A</i>	36
Tabela 4. Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos rs11171806 e rs2066808	38
Tabela 5. Frequência absoluta e relativa dos haplótipos e correspondentes genótipos para os SNPs rs2066808 e rs11171806 do gene <i>IL23A</i>	39
Tabela 6. Haplótipos no locus do gene da <i>IL-23A</i> em pacientes DM1A e controles	40
Tabela 7. Frequência absoluta e relativa do haplótipo GG nos grupos étnicos	40
Tabela 8. Frequência alélica e genotípica das variantes do gene <i>IL-23R</i> em Pacientes DM1A e controles	41
Tabela 9. Influência do haplótipo GG das variantes rs2066808 e rs11171806 do gene <i>IL-23A</i> nos autanticorpos e concentrações do Peptídeo C e <i>IL-23</i>	42
Tabela 10. Influência do haplótipo GG das variantes rs2066808 e rs11171806 do gene <i>IL-23A</i> nos autoanticorpos, concentrações de peptídeo C e de <i>IL-23</i>	43

Lista de Figuras

Páginas

Figura 1. Apresentação do antígeno aos linfócitos T CD4+ através das moléculas do Complexo Maior de histocompatibilidade classe II(MHC)	4
Figura 2. . Localização dos genes do sistema HLA no braço curto do cromossomo seis	8
Figura 3. Via de ativação linfocitária mostrando as interleucinas e fatores de transcrição envolvidos com a diferenciação de cada subtipo de Linfócito T CD4+, e as ações destas células em algumas doenças.	12
Figura 4. Representação do receptor da IL-23 e da IL-12 com seus sinalizadores	15
Figura 5. Células alvo onde a IL-17/IL-23 atuam e doenças implicadas	20
Figura 6. Ilustração do cromossomo 12, com a localização do gene <i>IL-23A</i> e, abaixo, a figura representativa dos quatro exons e região 5' proximal	25
Figura 7. Foto do gel de agarose a 2%, mostrando o tamanho dos fragmentos do gene <i>IL-23A</i> amplificados pela PCR	27
Figura 8. Eletroferograma de parte do gene <i>IL-23A</i> (paciente controle)	37
Figura 9. Eletroferograma de parte do gene <i>IL-23A</i> (paciente com a variante em Heterozigose.	37

Costa VS. **Associação do gene *IL23A* com proteção ao diabetes tipo 1 autoimune.** [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

RESUMO

Introdução: Diabetes tipo 1A(DM1A) é uma doença causada pela destruição autoimune das células beta. Em adição aos linfócitos T helper 1(Th1) e Th2, um subtipo específico de células T helper recentemente descrito, Th17, caracterizado pela produção das interleucinas 17(IL-17A), IL-17F e IL-22, está também envolvido na imunidade adaptativa e autoimunidade, incluindo DM1A. A IL-23 tem função fundamental na expansão e sobrevivência das células Th17. A mesma é composta por 2 subunidades: a p19-específica (IL-23A) e a p40. Variantes dos genes *IL-23A* e de seu receptor (*IL-23R*) ou o aumento das concentrações séricas da IL-23 estão associados a várias doenças autoimunes, mas seus efeitos no DM1A não estão definidos. Com o intuito de avaliar a importância da IL-23 na patogênese do DM1A, as variantes dos genes *IL23A* e *IL23R* foram analisadas. **Metodologia:** A região codificadora e os regiões intrônicas proximais do gene *IL23A*, incluindo a região 5' proximal foram sequenciadas. Duas variantes do gene *IL23A* (rs2066808 e rs11171806) e duas do gene *IL-23R* (rs11209026 e rs10889677) foram também genotipadas. A amostra contou com 370 pacientes com DM1A e 351 indivíduos controles saudáveis. As medidas das concentrações séricas da IL-23 e os autoanticorpos pancreáticos e extra-pancreáticos foram determinados. **Resultados:** Observamos somente uma, das seis variantes descritas em regiões codificadores da *IL-23* nos bancos de dados (rs11171806 G>A localizada no exon 3), e descrevemos uma nova variante no gene *IL-23A*, que consistiu na substituição da citosina por timina na posição c.-403 (C>T) na região 5' proximal deste gene (em heterozigose em apenas uma paciente com DM1A, do sexo feminino, com 28 anos ao diagnóstico). Os alelos G das variantes rs11171806 e rs2066808 estiveram em forte desequilíbrio de ligação ($D' = -0,825$ para controles, $p < 2,0 \times 10^{-6}$ e $D' = -0,902$, $p < 2,0 \times 10^{-17}$ para pacientes). Em consequência, a análise dos haplótipos destas variantes foi realizada. O haplótipo GG foi mais frequente

nos controles (16.7%) do que nos pacientes com DM1A (9.5%), conferindo proteção à doença ($p_c = 0,0009$, OR = 0,53). A presença do haplótipo GG diferiu de acordo com a etnia no conjunto de pacientes e controles, sendo menor naqueles de etnia caucasóide (18%) em relação aos outros grupos (39%); $p < 0.0001$. Entretanto, o efeito protetor da haplótipo GG foi independente da etnia. As duas variantes do gene *IL23R* (rs10889677 e rs11209026) tinham frequência alélica e genotípica semelhante entre pacientes com DM1A e controles. Não foi observada diferença significativa nas concentrações da IL-23 entre 135 pacientes com DM1A ($5,65 \pm 14,0$ pg/mL) e 112 indivíduos controles ($9,06 \pm 23,7$ pg/mL) ($p = 0,18$). , mesmo quando analisamos apenas o pacientes com duração do diabetes inferior a dois anos, nos quais a resposta imune contra as células beta ainda está presente, (4.65 ± 6.94 pg/mL e 9.07 ± 23.62 pg/mL, $p = 0.076$). Não foi encontrada associação entre as variantes do gene *IL23A* com a idade diagnóstica, presença do peptídeo C residual e auto-anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico em pacientes com diagnóstico recente de DM1A. Estas variantes também não influenciaram na frequência dos auto anticorpos extrapancreáticos: anti-tireoglobulina, anti-peroxidase, anti-21 hidroxilase, fator anti-núcleo, fator reumatóide e anti-citoplasma de neutrófilos. **Conclusões:** O haplótipo GG das variantes do gene *IL23A* (rs11171806 e rs2066808) foi associado à proteção ao DM1A. As variantes do gene *IL23R* (rs11209026 e rs10889677) não foram associadas ao DM1A. As concentrações séricas da IL-23 foram semelhantes entre os grupos.

Descritores: Diabetes mellitus tipo 1; Sistema imunológico; Interleucina-23

Costa VS. ***IL23A* gene association with protection to type 1 autoimmune diabetes mellitus**. [thesis] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

SUMMARY

Introduction: Type 1 diabetes mellitus (T1D) is a disorder caused by the immune-mediated destruction of insulin-secreting pancreatic beta cells. In addition to T helper 1 (Th1) and Th2 cells, a recently discovered subset of T helper cells, Th17, characterized by the production of interleukin 17 A (IL-17A), IL-17F, and IL-22 is also involved in adaptive immunity and autoimmunity, including T1D. The Interleukin IL-23 has a central role in the expansion and survival of Th 17 cells. It is composed of two subunits: p19-specific (IL-23A) and p40. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *IL-23A* and *IL-23 receptor (IL-23R)* genes or increased IL-23 serum concentrations were associated with several autoimmune diseases, but their role in T1D has not been defined. We therefore searched for variants of *IL-23A* and *IL-23R* genes that could predispose to T1D. **Methods:** The coding regions and boundary intron sequences of *IL-23A* gene, including the 5' proximal region were sequenced. Two variants (rs2066808 and rs 11171806) of *IL-23A* and two of *IL-23R* (rs11209026 and rs10889677) genes were also genotyped. IL-23 serum levels and pancreatic and extra-pancreatic auto-antibodies were also determined. The cohort involved 370 patients with T1D and 351 healthy control subjects. **Results:** We observed only 1 out of 6 *IL-23A* coding variants (rs11171806 G>A localized in exon 3) described in a database repository. A new allelic variant of the *IL-23A* gene, consisting of the substitution of a cytosine by a thymine at position c.-403 (C>T) in the 5' proximal region of the *IL-23A* gene (found in heterozygosis in only 1 female patient with T1D) was described. The G alleles of rs11171806 and rs2066808 variants of *IL-23A* gene were in strong linkage disequilibrium ($D' = -0,825$ for controls, $p < 2,0 \times 10^{-6}$ and $D' = -0,902$, $p < 2,0 \times 10^{-17}$ for patients). So, further analyses were performed with the haplotypes instead of separated SNPs. The GG haplotype was more frequent in controls (16,7%) than in T1D

patients (9,5%), conferring a protection to the disease ($p_c = 0,0009$, OR = 0.53). The presence of haplotype GG was also different according to the ethnic group in the overall sample (patients+controls), when we pooled the Caucasians (18%) against the other groups (39%); $p < 0.0001$. However, the lower susceptibility to T1D conferred by GG haplotype was independent of the ethnic group. Two *IL-23R* gene variants (rs10889677 and rs11209026) were also analyzed. The allelic and genotypic frequency of the variants did not differ between patients with T1D and control subjects. No significant differences were observed between the plasma IL-23 concentrations of 135 T1D patients (5.65 ± 14.0) and 112 control subjects (9.06 ± 23.7) ($p = 0.18$), even when only the patients with less than 2 years' disease duration ($n = 43$), when the immune attack to beta cells is still present, were included (4.65 ± 6.94 pg/mL and 9.07 ± 23.62 pg/mL, $p = 0.076$). No association was found between *IL-23A* variants with age at diagnosis of diabetes, presence of residual C-peptide levels or frequency of glutamic acid anti-decarboxylase antibody in patients with recent-onset T1D. Furthermore, these variants were not related to the presence of the extrapancreatic autoantibodies such as thyroid peroxidase (TPO) Ab, thyroglobulin (TG) Ab, 21-Hydroxylase (21OH) Ab, Anti nuclear factor (ANA) Ab, rheumatoid factor (FR) Ab and Neutrophil cytoplasmic (ANCA) Ab. **Conclusions** : The GG haplotype of *IL23A* gene variants(rs11171806 and rs2066808) was protective against T1D. The *IL23R* variants (rs11209026 and rs10889677) were not associated with susceptibility to T1D . IL-23 serum concentrations did not differ between T1D patients and controls.

Descriptors: Type 1 diabetes mellitus; immunologic system; interleukin-23

1.0 - Introdução

O diabetes mellitus tipo 1 A(DM1A) é uma doença crônica causada pela destruição autoimune das células beta (β) pancreáticas¹.

Ocorre principalmente em crianças, adolescentes e adultos jovens, mas pode apresentar expressões heterogêneas, iniciando-se na fase adulta, com achados semelhantes aos dos diabetes tipo 2. Fatores genéticos influenciam tanto a susceptibilidade quanto à resistência à doença. Embora a maioria dos pacientes com DM1A não tenha história familiar, há uma prevalência de 6% entre irmãos e esta concordância pode chegar a 70 % em gêmeos monozigotos². Como mecanismo deflagrador da resposta autoimune, temos os fatores ambientais, particularmente, infecções virais e alimentos.

1.1- Fatores ambientais

Os fatores iniciadores da resposta imune ainda não estão bem estabelecidos, mas o que se postula é que vários tipos de influências contribuem para essa autoimunidade. Mecanismos ambientais podem favorecer o início da doença, corroborando para o aumento da incidência do DM1A em determinadas populações.

Uma das hipóteses é a teoria da higiene em que medidas sanitárias aumentariam o risco de doenças autoimunes³.

Fatores perinatais podem favorecer o aparecimento do DM1A, como descreve estudo multicêntrico europeu que envolveu 892 crianças com diabetes tipo 1 e 2.291 controles normais. Dentre eles, estão: idade materna acima de 25 anos, pré-eclampsia, icterícia neonatal e doença respiratória perinatal. Com relação aos fatores protetores foram encontrados: baixo peso ao nascer, baixa estatura e ser o primeiro da prole⁴.

Determinados vírus estão implicados no diabetes em modelos animais, destruindo diretamente as células β e, ao mesmo tempo, promovendo a liberação de antígenos, os quais perpetuam a resposta

imune. Em seres humanos, há achados controversos. Estudo de autópsia não encontrou evidência de infecção persistente pelos vírus coxsackie, caxumba, epstein-barr ou citomegalovírus nos tecidos pancreáticos de 75 pacientes que morreram poucas semanas após o diagnóstico de DM1A⁵. Por outro lado, o anticorpo IgM contra o vírus coxsackie B foi encontrado em 39% das crianças com diagnóstico recente de DM1A contra 6% de uma população normal⁶. Revisão sistemática mais recente⁷, envolvendo 33 estudos de prevalência, nos quais participaram 1.931 pacientes diabéticos e 2.517 controles, mostrou associação significativa entre a infecção pelo enterovírus, detectada por métodos moleculares, e o diabetes tipo 1A.

A rubéola congênita também é relacionada com o diabetes mellitus tipo 1A de início precoce, apesar de alguns achados controversos. Postula-se que o vírus possa atuar inibindo a formação das células β pancreáticas⁸.

Algumas bactérias, principalmente as da flora intestinal, podem agir expondo alguns antígenos próprios ao sistema imune, os quais, pela semelhança antigênica com alguns componentes das células β , gerariam destruição imune. Essa hipótese é baseada em estudos envolvendo camundongos diabéticos não obesos (NOD), em que a administração de probióticos preveniu a agressão pancreática⁹.

O leite de vaca, em particular, a albumina, é sugerido como provável promotor da autoimunidade pancreática, perante o achado de reação cruzada entre anticorpos contra esta proteína e antígenos das células β . Um dos principais estudos que evidencia esta hipótese é o TRIGR (Trial to reduce IDDM in the Genetically at Risk), ainda em andamento, que mostrou que fórmulas hidrolisadas de leite de vaca, menos antigênicas, diminuíam o risco do desenvolvimento do DM1A.¹⁰ A proteína do trigo e, mais especificamente o glúten, merecem atenção, pois pacientes com diabetes tipo 1A tem aumento da reatividade de linfócitos T periféricos ao glúten, quando comparados com indivíduos controles saudáveis.¹¹

Ao contrário dos fatores dietéticos anteriores, que aumentam o risco do DM1A, a vitamina D pode ser um fator protetor. Esta, efetivamente, inibe a diferenciação das células dendríticas e a ativação imune. Verificaram-se

concentrações diminuídas da vitamina D em pacientes com DM1A e que o aumento da sua ingestão reduz a incidência da doença em humanos¹².

1.2 - Patogênese do DM1A

1.2.1- Imunidade Celular

No camundongo diabético não obeso (NOD), modelo animal do diabetes autoimune, foi descrita a perda progressiva das células beta pancreáticas desde o início do insulto imunológico nas ilhotas pancreáticas até os estágios finais da doença. Apesar disso, há grande variação no padrão dessa perda desencadeada pela inflamação local, a qual depende da contínua exposição de novos antígenos pancreáticos, de intercorrências infecciosas, de demandas metabólicas e de processos protetores, como a regeneração das células β . A inflamação estimula a regeneração celular, mas, ao mesmo tempo, expõe novos antígenos que podem levar à resposta imune¹³.

No processo de destruição das células β , temos que o remodelamento das células beta pancreáticas, no período neonatal, ocasiona a liberação de antígenos que, associados a fatores ambientais desencadeadores como, por exemplo, infecções virais, levam à apresentação de epitopos pelo complexo maior de histocompatibilidade classe I (MHC), presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC). As mesmas ativam células T CD8+ que causam lesão das células beta de forma direta e também pela liberação de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o interferon beta (IFN- β). Esse processo inicial é denominado insulite. Componentes das células β , como a enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65(GAD₆₅) e a insulina, são fagocitados pelas células dendríticas e transportados para linfonodos regionais. Nesse local, há o processamento e a apresentação desses antígenos às células T CD4+ pelas moléculas MHC classe II, promovendo sua expansão clonal. Essas células se dirigem ao pâncreas recrutando células inflamatórias,

agravando ainda mais o processo inicial da insulite¹⁴. A figura 1 ilustra a interação entre as células apresentadoras de antígenos e os linfócitos T.

Figura 1. Apresentação do antígeno aos linfócitos T CD4+ pelas moléculas do Complexo Maior de histocompatibilidade classe II (MHC).

1.2.2 - Imunidade Humoral

O antígeno específico da célula β , alvo inicial do sistema imune, não está definido, mas os autoanticorpos contra vários componentes das células β , presentes no soro de pacientes diabéticos recém-diagnosticados e de indivíduos que posteriormente desenvolvem a doença, são importantes marcadores da progressão desta¹⁵.

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

Os marcadores humorais mais frequentes da agressão imune são os anticorpos anti-insulina (IAA), anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático (ICA), anti-GAD₆₅ e antiproteína de membrana com homologia às tirosinafosfatases ou antiantígeno 2 do insulinoma (anti-IA2). Tais autoanticorpos são raros na população controle não diabética, com frequência de 2 a 5%.

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

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

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

O anticorpo anti-IA2 é mais comum entre indivíduos jovens (até 15 anos de idade) e indica rápida progressão para o diabetes manifesto. Diferentes isoformas do IA-2 no timo e no baço, comparadas às do pâncreas, podem induzir autoimunidade à sequência IA-2 não presente nos tecidos linfoides¹⁶.

Outro autoanticorpo recentemente estudado no DM1A é o Anti-ZnT8 (Antitransportador 8 do Zinco). O zinco forma grânulos com a insulina, sendo importante no seu estoque nas células β . Cerca de 60-80 % dos pacientes com início recente da doença apresentam títulos elevados desse anticorpo.¹⁷

Os autoanticorpos, em altos títulos ao diagnóstico, tendem a desaparecer com o tempo, à exceção do anti-GAD₆₅. Davini et al¹⁸ observaram altos títulos e maior frequência de autoanticorpos (2-3 autoanticorpos positivos) nos primeiros cinco anos de duração da doença em pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo. Já os títulos de anti-GAD₆₅ se mantiveram mais constantes com a progressão da doença. Anti-IA2 predominou nos portadores dos alelos HLA DRB1*04 e DQB1*0302, de susceptibilidade ao diabetes.

Estudos recentes descreveram a possibilidade de se detectar populações de risco para o desenvolvimento do DM1A, baseando-se na presença de autoanticorpos séricos contra múltiplos antígenos pancreáticos.

Esses estudos encontraram correlação significativa entre a presença de dois ou mais autoanticorpos e o desenvolvimento de diabetes em indivíduos com familiares diabéticos e até mesmo em indivíduos para os quais não havia nenhum caso familiar de DM1A, que corresponderam a 90% dos casos de diagnóstico dessa doença.¹⁹

1.2.3 - Genética do DM1A

Mais de 40 *loci* envolvidos na susceptibilidade ao DM1A foram descritos como sendo denominados IDDMs:

- IDDM1(Complexo Maior de Histocompatibilidade-MHC): O principal *locus* envolvido na susceptibilidade ao diabetes está localizado no braço curto do cromossomo 6 e é responsável por 40 a 50 % da herança genética de predisposição ao DM1A.
- IDDM2 - gene da insulina: A insulina é o único antígeno fortemente associado com as células β pancreáticas. Vários tipos de células T CD8+ ativadas contra a molécula de insulina foram encontrados em indivíduos diabéticos. A região VNTR do gene da insulina interfere com a expressão da insulina no timo e com a deleção de linfócitos autorreativos.
- PTPN22- não receptor da proteína tirosina fosfatase 22. O gene *PTPN22* está localizado no cromossomo 1p3 e codifica uma tirosina-fosfatase linfocitária que inibe a ativação das células T.

Outros *loci* implicados na predisposição ao DM 1A incluem os genes que codificam as citocinas inflamatórias como a interleucina 12 (IL-12), a IL-2, a IL-6, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o interferon gama (IFN- γ) e a IL-17, recentemente descoberta.

1.2.4 - MHC - Complexo maior de histocompatibilidade - IDDM1

O complexo maior de histocompatibilidade humano (MHC) foi descoberto na década de 1950, quando anticorpos leucoaglutinadores foram identificados no soro de pacientes transfundidos e no soro de mulheres múltiparas²⁰. O sistema HLA (antígeno leucocitário humano) é o complexo de genes mais polimórfico entre os mamíferos. O entendimento do termo polimorfismo é essencial para a compreensão dos mecanismos de associação com as doenças, da evolução das espécies e, também, para a seleção de doadores em transplantes de órgãos ou células. Alguns genes apresentam a mesma sequência de ácidos nucleicos em todos os membros de uma população, sendo chamados de não polimórficos, e as variantes do gene polimórfico são denominadas alelos.

Dois tipos de estudos têm sido utilizados para abordar a associação entre marcadores de histocompatibilidade com as doenças, ou seja, os estudos populacionais e os familiares, sendo os populacionais, os mais fáceis de serem realizados. Nestes, as frequências dos antígenos ou dos alelos HLA, observadas em um grupo de pacientes não aparentados, são comparadas com as dos indivíduos controle sadios, utilizando-se os dados de uma tabela de contingência 2x2.²¹

O principal *locus* envolvido na susceptibilidade ao diabetes se encontra dentro do MHC, no braço curto do cromossomo 6, que provê 40 a 50% do risco hereditário para o diabetes. Antígenos exógenos ou endógenos são endocitados e clivados dentro de células denominadas “apresentadoras de antígenos”, gerando peptídeos que são acoplados às moléculas MHC na superfície dessas células e apresentados aos linfócitos T.

FONTE-Davini E et al¹⁸.

Figura 2. Localização dos genes do sistema HLA no braço curto do cromossomo 6.

Como ilustrado na figura 2, o sistema MHC ou HLA (antígeno leucocitário humano) é dividido em classes I, II e III. As moléculas MHC classe I estão presentes na maioria das células somáticas, enquanto as de classe II, nas células imunologicamente competentes: linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas. A molécula MHC classe III codifica proteínas relacionadas também com a resposta imune.

As moléculas MHC classe I são compostas por duas cadeias (α e β). Na dependência da sequência de aminoácidos presentes na cadeia pesada α , a esta é subdividida em $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$.

As moléculas MHC classe II são formadas pelas cadeias $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$. São subdivididos em moléculas DQ, DR, DP, TAP, LMP e DM, segundo as diferentes sequências de aminoácidos dessas cadeias.

É importante saber que nem todos os indivíduos portadores de alelos associados à susceptibilidade a determinadas doenças irão desenvolvê-las, e que muitos daqueles acometidos por doenças associadas ao HLA não portam antígenos e alelos associados a ela²².

O mecanismo exato pelo qual o MHC atua na predisposição do DM1A não está completamente elucidado, mas possivelmente envolve o processo de deleção de clones de linfócitos autorreativos no timo. O polimorfismo das moléculas de classe II parece interferir na sua ligação com o peptídeo

antigênico e o receptor do linfócito T e determina deleções mais ou menos efetivas desses linfócitos, conferindo resistência ou susceptibilidade para a doença, respectivamente²³.

A maioria da população caucasiana diabética apresenta os alelos HLA-DR3 ou HLA-DR4 classe II em heterozigose. O subtipo HLA-DQ classe II é o que confere maior susceptibilidade genética e está em desequilíbrio de ligação com os alelos –DR3 e –DR4. Em pacientes caucasianos, os heterodímeros HLA-DQA1*0301/ HLA-DQB1*0302 e o HLA-DQA1*0501/ HLA-DQB1*0201 são os mais frequentes no diabetes. O haplótipo DQA1*0102 / DQB1*0602 / DRB1*1501 está negativamente associado ao diabetes tipo 1A, presente em menos de 1% das populações estudadas¹. O alelo DQB1*0602 confere maior proteção ao diabetes tipo 1A de início na infância e adolescência. Parece que este direciona a resposta T helper 2 (Th2) dos linfócitos CD4+, que leva à produção de anticorpos.

No Brasil, existem alguns estudos sobre a frequência dos alelos HLA de classe II na população. Davini e cols.¹⁸ observaram os seguintes haplótipos como determinantes dos maiores riscos relativos (RR) para diabetes: HLA-DRB1* 03/DQB1*0201 em 45,2% (RR =2,6) e -DRB1*04/ DQB1*0302 em 52,7% (RR=2,9) dos diabéticos x 17,8 e 16,3% dos controles, respectivamente. Já os haplótipos -DRB1*11/DQB1*0301, -DRB1*13 /DQB1*0602, -DRB1*13/DQB1*0603 e -DRB1* 15/DQB1*0602(RR=0,14) conferiram proteção, à semelhança das populações caucasianas. Os maiores riscos relativos foram conferidos pelos genótipos -DR3/DR4 em 23,6% (RR= 6,7) e -DQB1*0201/0302 em 20,9% dos pacientes (RR =18,4%) X 3,3 e 1,1 % dos controles, respectivamente.

Alves e cols. analisaram cinco outros estudos sobre alelos e haplótipos do sistema HLA no Brasil, confirmando a maior susceptibilidade para os haplótipos DR3/DQ2 e DR4/DQ8 e para os alelos HLA classe I -A2; -B8; -B13 e -B15 e a proteção para alelos-DQB1*0602 e -DQB1*0301, DR2 e DR7²⁴.

1.3 - Via de Ativação dos linfócitos T helper 17(Th17) pela interleucina 23(IL-23)

A homeostase das células T, ou seja, o desenvolvimento e a manutenção dos números e funções das células T são essenciais para a integridade do sistema imune²⁵. Os progenitores das células T, provenientes da medula óssea, migram para o timo, onde sofrem vários processos de seleção e apoptose, dirigindo-se para a periferia como células T maduras, porém *naïve*. Quando as células T *naïve* encontram um antígeno apropriado, estas proliferam e se diferenciam em linfócitos T efetores, os quais são divididos em linfócitos T helper, que orquestram a resposta imune por ativarem outras células imunológicas e os linfócitos T citotóxicos, responsáveis pela erradicação das células alvo. Proteínas de membrana celular podem ser utilizadas como marcadores para se distinguir as subpopulações de linfócitos T. A maioria dos linfócitos T helper expressa a proteína de superfície CD4, ou seja, são linfócitos CD4+.

Em 1986, Mosmann e Coffman introduziram o conceito de tipos distintos de linfócitos T CD4+, baseado nas citocinas que produziam. Eles denominaram esses linfócitos como T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). As células Th1 sintetizam interferon gama (IFN- γ), induzem as reações de hipersensibilidade tardia, ativam macrófagos e são essenciais na defesa contra patógenos intracelulares. Já os linfócitos Th2 produzem IL-4 e promovem a formação de imunoglobulina E, sendo importantes contra infecções parasitárias.²⁶

Entretanto, vários estudos mostraram a existência de outros subtipos celulares, também envolvidos em vias inflamatórias e regulatórias diferentes daquelas. A identificação de subtipos adicionais dos linfócitos Th tem ajudado a explicar algumas discrepâncias nas teorias originais da resposta imune. Na década de 1990, uma nova população de células T CD4+ foi identificada e denominada células T reguladoras (Treg). Já foram definidas várias funções para essas células, dentre elas: prevenção de doenças autoimunes, supressão da alergia e da asma, indução da tolerância imune

contra antígenos da dieta e indução da tolerância materna contra o feto, entre outras.

Existem alguns marcadores de superfície que identificam essas células como o CD25. Estas têm, como fator de transcrição, o *forkhead box p3* (foxp 3). À semelhança de outras células T, sua ação supressora é mediada por antígenos. Estudos *in vitro* têm demonstrado que as células Treg necessitam ser primeiramente ativadas pelas células apresentadoras de antígenos para se tornarem supressoras. Isso significa que sua ativação é antígeno específica²⁷. No modelo de diabetes autoimune em camundongos, as células Treg específicas para antígenos pancreáticos estavam em menor número que a dos animais controles, sugerindo que a diminuição do efeito dessas células possa ser um dos fatores na etiopatogênese da doença.

Mais recentemente, foi mostrado que alguns linfócitos T CD4+ produziam citocinas que diferiam daquelas sintetizadas pelas células Th1 e Th2. Além disso, muitas doenças autoimunes anteriormente relacionadas à via Th1, mas que não podiam ser explicadas somente por ela, estavam ligadas a essas vias alternativas. As células Th17, com a IL-17, compreendem uma dessas novas vias, já associadas a várias doenças autoimunes como: artrite reumatoide, dermatite, asma, encefalomielite autoimune e doença inflamatória intestinal. Simultaneamente, evidenciou-se que essas células exerciam papel protetor contra agentes infecciosos, promovendo o recrutamento de neutrófilos e ativando os macrófagos.²⁸

Sabe-se que a diferenciação das células T CD4+ imaturas (*naive*) em células efetoras é controlada por vários fatores mutuamente inibitórios, ilustrada na figura 3. A IL-12 aumenta a expressão do fator de transcrição T “*Box Express in T cells*” (Tbet) e da proteína transdutora e ativadora do sinal da transcrição (STAT-4), que promovem o desenvolvimento das células Th1. Até recentemente, era a principal via ligada à autoimunidade, e parte dos seus efeitos é hoje atribuída à via Th17. A IL-4 ativa o fator de transcrição STAT-6, o qual ativa o fator de transcrição ligado à proteína 3 (GATA-3), que é o principal determinante da via Th2. Tanto a IL-10 como o fator de

crescimento transformador beta (TGF- β) induz à diferenciação das células regulatórias, que são críticas na resposta imune ²⁹.

A diferenciação das células Th17 em humanos envolve, principalmente, as citocinas TGF- β , a IL-23 e a IL-6. O TGF- β e a IL-6 ativam o fator de transcrição “*retinoid related orphan receptor-gamma*” (ROR γ t), que está relacionado com a via Th17. A IL-6 também ativa o fator de transcrição STAT 3 que age em sinergia com ROR- γ t para maturação das células Th17. A IL-23, associada com a IL-21, tem um papel central na expansão e sobrevivência dos linfócitos Th17 (Figura 3).

Figura 3. Via de ativação linfocitária mostrando as interleucinas e fatores de transcrição envolvidos com a diferenciação de cada subtipo de Linfócito T CD4⁺ e as ações destas células em algumas doenças.

Embora as células Th17 tenham esse nome, pela citocina que produzem, elas também secretam outras citocinas como a IL-21, a IL-22, o TNF alfa e a IL-6^{30,31}. As células Th17 são as principais produtoras da IL-17, seguida pelos neutrófilos³². As células Th17 expressam receptores de citocinas, as quais promovem seu recrutamento no processo inflamatório. O receptor *chemokine (C-C motif) receptor 6* CCR6 é altamente expresso nas membranas destas células e, quando estimulado, gera influxo de cálcio intracelular que as ativa.³³ Já há evidências que a IL-17 tem papel protetor contra infecções bacterianas e fúngicas, tendo como função a produção de citocinas que recrutam os macrófagos e neutrófilos. Adicionalmente, a IL-17 limita a ativação dos neutrófilos durante o processo inflamatório, evitando a sua perpetuação danosa. Ratos com defeito no receptor da IL-17 têm diminuição do recrutamento de neutrófilos e aumento da mortalidade após infecção por *Klebsiella pneumoniae*.

A IL-17 existe, aparentemente, como homodímero, mas a sequência de aminoácidos em contato com o seu receptor não está definida.³⁴ O gene que codifica a IL-17 está localizado no cromossomo seis, com uma região promotora 5 'proximal³⁵.

O receptor da IL-17 contém um domínio transmembrana e uma grande cauda citoplasmática³⁶. O mesmo é expresso nos fibroblastos, osteoblastos, células epitelioides, astrócitos, neutrófilos, células endoteliais e musculares, sugerindo efeitos pleiotrópicos da IL-17³⁷. Sua sinalização envolve a ativação do Act-1, proteína citoplasmática que desencadeia vias fosforilativas como a I κ B kinase (IKK)³⁸.

A IL-17 está envolvida na imunorregulação, na manutenção da homeostase da inflamação e na expressão de doenças inflamatórias, com a produção de fatores inflamatórios como a IL-6, IL8, TNF-alfa e o fator estimulador de colônia de macrófago (GM-CSF), todos envolvidos na autoimunidade. Sugere-se que os linfócitos Th17 funcionam como ativadores do sistema imune inato após um segundo contato com pequenas concentrações de antígenos que seriam insuficientes para ativá-lo sem a

presença dessa população de linfócitos³¹. Ratos deficientes da IL- 17 e IL-23 são menos susceptíveis a doenças autoimunes como a encefalomielite, artrite induzida pelo colágeno e colite²¹. A expansão e sobrevivência dos linfócitos Th17 são dependentes da IL-21 e IL-23.

1.4 - Estrutura da IL-23

A IL-23 é uma citocina pró inflamatória, composta pelas subunidades p-19, específica (IL-23A) e uma p-40, que é compartilhada com a IL-12 (Figura 4). O gene da subunidade p 19, composto por 4 exons e 3 introns, está localizado no cromossomo 12q13.3, enquanto o da p 40 consiste de 8 exons e 7 introns, localizado no cromossomo 11q1.3. Embora a subunidade p 19 tenha homologia com a subunidade p 35 da interleucina 12, elas operam em diferentes vias da ativação linfocitária. Ambas têm homologia com a estrutura da IL-6 e o GM-CSF, fazendo-as membros da classe das citocinas de cadeias longas, enquanto a subunidade p40 tem estrutura similar aos receptores de citocina classe I, como o fator neurotrófico ciliar³². O receptor da IL-23 (IL-23R) é um complexo heterodimérico, composto pelas subunidades IL-12R β 1 e IL- 23R³⁴. Faz parte dos receptores transmembrana tipo I e sua região extracelular contém uma sequência de sinalização semelhante à do domínio N-terminal das imunoglobulinas e à porção intracelular, resíduos de tirosina que são fosforilados pela ação das Janus Kinases³⁹. O receptor da IL-23 não é expresso nos linfócitos T imaturos e sabe-se que a IL-23 não está envolvida na maturação inicial das células Th17.

A IL-23 ativa o mesmo espectro da Janus Kinase (JAK)/Transdutores e ativadores da transcrição(STAT) que a IL-12, como: JAK 2, STAT 1, STAT 2, STAT 3, STAT 4 e a STAT 5. Entretanto, a IL-23 induz maior fosforilação da STAT 3 que da STAT 4, sendo o inverso da IL-12³⁵.

FONTE- Lankford CS ³⁵.

Figura 4. Representação do receptor da IL-23 e da IL-12 com seus sinalizadores.

1.5 - IL-23 na imunidade inata e adaptativa

Enquanto a IL-12 direciona para a resposta Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ , a IL-23 leva à maturação das células Th17.

As células dendríticas (DC) e os macrófagos são componentes centrais na resposta imune inata. Eles governam o balanço entre tolerância e autoimunidade. Para isso, participa uma família de receptores de sinalização denominados receptores *Toll-Like* (TLR), presentes nessas células. A IL-23, ativadora da via Th17, é produzida por células dendríticas sentinelas e macrófagos, poucas horas após exposição à lipopolissacarídeos e outros antígenos bacterianos, que ocasionam estímulo rápido das células Th 17. Estas promovem a produção de IL-1, IL-6, IL-8 e TNF-alfa, que recrutam neutrófilos para o local da infecção⁴⁰. Portanto, a IL-23 é importante no direcionamento precoce da resposta imune contra patógenos.

Na ausência da resposta rápida do eixo IL-23/IL-17, os animais são mais suscetíveis à septicemia⁴¹. Em virtude disso, a IL-23 é essencial na sobrevivência contra injúrias infecciosas intensas, em que a imunidade celular é crítica para prevenir a necrose tecidual e a disseminação da infecção. Já a ativação da via Th1 requer dias para ser efetiva, podendo ser tardia demais em algumas situações. Entretanto, o custo da resposta celular

rápida com a via IL-23/IL-17 pode ser alto, pois se este eixo sofrer uma desregulação poderá haver a quebra da tolerância contra tecidos próprios, gerando várias doenças autoimunes como a esclerose múltipla, a artrite reumatoide, a psoríase e o diabetes autoimune⁴².

1.6 - Eixo IL-17/IL-23 nas doenças autoimunes

1.6.1- Diabetes tipo 1A

A primeira indicação de que o diabetes tipo 1A é uma doença autoimune veio da análise histológica do pâncreas de paciente falecidos precocemente. Nesses pacientes, foi evidenciada a presença do infiltrado linfocitário nas ilhotas pancreáticas⁴³.

Desde que os órgãos alvos do diabetes (ilhotas pancreáticas e linfonodos peripancreáticos) são inacessíveis em seres humanos vivos, o estudo do DM1A tem sido baseado em modelos animais como os camundongos diabéticos não obesos (NOD), que espontaneamente desenvolvem o DM com características semelhantes às do DM1A.

Entretanto, está claro que o sistema imune dos humanos e ratos tem suas diferenças, o que não nos permite extrapolar todos os achados para os pacientes diabéticos. Embora não se saiba os mecanismos precisos para o desenvolvimento do diabetes nos camundongos NOD, observa-se a participação ativa das células T, pois o tratamento desses animais com anticorpos contra o CD3, que ativa essas células, induz à remissão da doença. Investigações detalhadas nesses animais têm indicado que as células Th1, envolvidas com o fator de transcrição T-bet e a secreção de citocinas, como o IFN- γ e a IL-2, são as principais mediadoras da autorreatividade contra as células beta-pancreáticas⁴⁴. A contribuição das células Th17 no diabetes autoimune em animais tem sido também estudada; níveis elevados da IL-17 são encontrados nas lesões insulíticas dos camundongos NOD e concentrações séricas aumentadas dessa interleucina estão associadas com o desenvolvimen-

to de diabetes nesses mesmos animais, o que corrobora que as vias Th1 e Th17 atuam no desenvolvimento dessa doença⁴⁵.

Em humanos, no estudo de Bradshaw ME et al⁴⁶, monócitos de pacientes diabéticos direcionam as células de memória CD4+ a secretarem IL-17. Macrófagos e células dendríticas dos pacientes com DM1A secretam IL-1 β , citocina envolvida na ativação das células Th17.

Arif S. et al demonstraram aumento do número das células Th17 reativas a antígenos pancreáticos no soro de pacientes com diagnóstico recente de diabetes (menor do que 20 semanas), além do aumento da expressão do gene da IL-17 nas ilhotas de Langerhans em um diabético que faleceu até 5 dias após o diagnóstico. Além disso, nesse mesmo estudo, foi demonstrado que a IL-17A, associada a IL-1 β , TNF- α ou IFN- γ , ocasionou a apoptose das células beta pancreáticas⁴⁷.

Administração de pequenas e múltiplas doses de streptozotocina em camundongos NOD levam à hiperglicemia sustentada, perda de peso, infiltração de monócitos nas células β pancreáticas e apoptose destas. Regimes curtos de streptozotocina não têm efeito deletério. Entretanto, a administração da IL-23 por 10 dias consecutivos, somado a um regime curto de streptozotocina, induz hiperglicemia e infiltração de monócitos nas células beta pancreáticas desses animais. O mecanismo molecular de ação dessa citocina ainda está em estudo⁴⁸.

Em trabalho recente, envolvendo camundongos submetidos a múltiplas doses de streptozotocina, substância diabetogênica, a imunização destes com células T CD4+ autorreativas inativadas, que leva à ativação de mecanismos reguladores da autoimunidade, reduziu a glicemia e a produção de IL-17 e IL-23 pelos linfócitos nas ilhotas pancreáticas. Tal fato ocorreu com a marcante redução da expressão do RNA mensageiro do ROR γ t e do STAT 3, que são sabidamente sinalizadores da ação da IL-23 nos linfócitos Th17⁴⁹. Esses achados fortalecem cada vez mais a importância do estudo dessa citocina em pacientes com DM1A.

Portanto, a via Th17 e sua citocina ativadora, a IL-23, parecem participar efetivamente na patogênese do diabetes autoimune em animais.

1.6.2 - Outras doenças autoimunes

A IL-17 e a IL-23 estão presentes no soro e líquido sinovial dos pacientes com artrite reumatoide⁵⁰. A IL-17 promove a destruição do colágeno, aumenta a reabsorção óssea por estimular a osteoclastogênese e lesiona a cartilagem. Ela também ativa fibroblastos sinoviais a produzirem IL-6, IL-8 e fatores de crescimento vascular⁵¹. Além desses achados, as concentrações de CCL20, citocina que atrai as células Th17 ao local da inflamação, estão elevadas nas articulações dos pacientes. Nestes, as concentrações séricas da IL-23 relacionaram-se com a atividade da doença⁵².

Nas lesões cutâneas psoriáticas, observou-se aumento da expressão do RNA mensageiro da IL-23A em relação à pele de indivíduos saudáveis controles. Várias terapias com eficácia comprovada incluem bloqueadores do TNF-alfa e da linfotóxina, os quais diminuem citocinas inflamatórias, incluindo a subunidade p-19 da IL-23⁵³. Nair RP et al demonstraram que a variante rs2066808(G>A), presente na região 3' UTR do gene da *IL-23A*, conferia OR de 1.68($p=2 \times 10^{-5}$) de risco para psoríase⁵⁴. Do mesmo modo, variantes do IL-23R também foram associadas a essa doença. O polimorfismo rs11209026, que codifica o aminoácido da porção intracitoplasmática do IL-23R, está associado (OR = 1.40, $p = 3.8 \times 10^{-4}$) à psoríase segundo estudo multicêntrico⁵⁵.

Na oftalmopatia de Graves, alguns polimorfismos do gene do *IL-23R*, como o rs2201841 e o rs10889677, estão fortemente associados com essa doença autoimune numa população norte-americana⁵⁶.

A doença celíaca é uma doença autoimune que afeta principalmente o intestino e sua patogênese estava centrada na ativação Th1. A descoberta da via Th17 promoveu uma reanálise desse processo e estudos mostraram a participação fundamental dessa nova via nessa doença tão prevalente. Em um estudo, foi observado aumento da concentração da IL-17A pelo método

de ELISA nas biópsias intestinais dos pacientes com essa doença em atividade, comparado com indivíduos saudáveis⁵⁷.

A espondilite anquilosante é também uma doença crônica autoimune que predominantemente afeta a coluna e as articulações sacroilíacas. Algumas citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4+ foram implicadas na patogênese dessa doença. Estudo recente evidenciou concentrações séricas aumentadas da IL-17 e IL-23 nos pacientes em relação aos controles normais⁵⁸.

A dermatite de contato é uma das doenças cutâneas mais comuns. A sensibilização a alérgenos em contato com a pele se dá por meio de células apresentadoras de antígenos locais que ativam linfócitos T em linfonodos regionais, levando à inflamação. Para investigar o envolvimento do eixo IL-23/Th17 na patogênese da dermatite de contato, Larsen et al⁵⁹ estimularam queratinócitos humanos com níquel *in vitro*, observando aumento da expressão da IL-23 nesses tecidos.

A figura 5 ilustra algumas das doenças já relacionadas ao eixo Th17/IL-23.

Figura 5. Células alvo em que a IL-17/IL-23 atua e doenças implicadas.

2.0 - Justificativa do Estudo

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

A via Th17 e seus moduladores, principalmente a IL-23, tem sido estudadas em várias doenças autoimunes como artrite reumatoide, doença celíaca, psoríase e diabetes autoimune em animais, estando já comprovadamente envolvidas como fatores predisponentes em algumas dessas patologias.

A IL-23 é citocina essencial para a manutenção e proliferação clonal das células Th17. Variantes (SNPs) do gene de sua porção específica, p 19, e de seu receptor (IL-23R) estão implicados na psoríase, na oftalmopatia de Graves, na espondilite anquilosante, na esclerose múltipla, dentre outras.

Não há estudos em humanos avaliando o papel da IL-23 no diabetes autoimune. Alterações no gene *IL-23A*, interferindo na sua expressão ou de seu receptor, interferindo na transmissão do sinal da citocina, poderiam favorecer a inflamação mediada pela IL-17 e o diabetes.

Investigamos, assim, a presença de mutações e/ou polimorfismos nos genes *IL-23A* e *IL-23R* que pudessem interferir com a sua ação e na predisposição ao diabetes tipo 1 no homem.

3.0 - Objetivos

Avaliar o papel do gene *IL-23A* na patogênese do DM1A, pela análise da sua região 5' proximal e regiões codificadoras, em pacientes DM1A e controles normais, buscando identificar polimorfismos ou mutações determinantes de susceptibilidade ao DM1A.

Avaliar o papel de variantes nos genes *IL-23A* e *IL-23R*, previamente implicadas em outras doenças autoimunes, no diabetes.

Associar as variantes encontradas com as manifestações clínicas do diabetes e produção de autoanticorpos.

4.0 - Material e Métodos

4.1 - Considerações Éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes, pais ou tutores, antes que os procedimentos de pesquisa fossem iniciados. Este projeto foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e aprovado como Protocolo de Pesquisa nº 0125-08.

4.2 - Casuística

4.2.1- Pacientes

As avaliações do gene *IL-23A* e *IL-23R* foram realizadas a partir do material genético do Banco de DNA de pacientes com DM1A pertencentes aos Laboratórios de Investigação Médica - Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio (LIM18) e Laboratório de Genética Molecular (LIM25) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Estes foram recrutados nos ambulatórios de Diabetes do Hospital das Clínicas ou encaminhados por médicos interessados na pesquisa.

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

Foram inicialmente incluídos na amostra 93 pacientes diabéticos, sendo estendido para 370 após análise estatística preliminar.

Critérios de inclusão:

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

Critérios de exclusão:

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

4.2.2 - Controles

Foram selecionados inicialmente 91 indivíduos controles saudáveis, sem história familiar de diabetes mellitus tipo 1 A e sem história prévia de qualquer doença autoimune. Após análise estatística inicial, a amostra foi estendida para 310 indivíduos controles.

4.3 - Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada para amplificação da região 5' proximal do gene *IL-23A* e da região codificadora do gene, composta por 4 exons e suas regiões flanqueadoras (figura 6).

A sequência referência do gene número ENSG00000110944 utilizada foi obtida no Banco de dados *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>)

As sequências dos iniciadores utilizados, temperatura de pareamento e tamanho do fragmento amplificado para a região 5' proximal e codificadoras do gene *IL-23A* estão descritos na tabela 1.

Região 5' proximal

[FONTE -www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

Figura 6. Ilustração do cromossomo 12, com a localização do gene *IL-23A* e, abaixo, a

figura representativa dos quatro exons e região 5' proximal

Tabela 1. Oligonucleotídeos selecionados para amplificação do gene *IL-23A*

Iniciadores	Sequência	Temperatura de pareamento
IL-23PF	5' CACCATCCTATTGGGAGATGA3'	60°C
IL-23PR	5' CCCTCAGTTGTTCACCCGAGT 3'	60°C
IL-23-1F	5' AATCCACCTGCTGTGAGTC 3'	60°C
IL-23-1R	5' CCACTCAAGGTCACGGTCTT 3'	60°C
IL-23-2F	5' CCACCTCTTCCTTCATTCCA 3'	60°C
IL-23-3R	5' TGTCTCTGACACCTGCAAGC 3'	60°C
IL-23-4F	5' ACAGAGGGTTGGGGGTTAAG 3'	60°C
IL-23-4R	5' TTTTCCATCGATTTCTCTTCC 3'	60°C

F=Forward R=Reverse

Para cada reação foi utilizado um volume final de 25 µL contendo: 100 ng de DNA genômico, 10 mM de cada dNTP, 10pmol do iniciador 5U/µL da enzima *Taq* DNA polimerase, tampão de reação 10X e MgCl₂ 50mM (*Invitrogen™ Life Technologies*, Brasil). A amplificação foi realizada no termociclador Veriti 96 well (*Applied Biosystems-Life Technologies, Foster City, CA, USA*). O protocolo de amplificação consistiu de um ciclo de 5 minutos a 94 °C seguido de 35 ciclos a 94 °C por 45 segundos, temperatura de pareamento de 60 °C por 45 segundos e a 72 °C por 1 minuto, seguido de um ciclo de extensão a 72 °C por 10 minutos e 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 Technology, Gaithersburg, MD, USA*). As amostras foram visualizadas sob transiluminação em luz ultravioleta (Eletronic U.V.-Transiluminator – Ultra Lum) e fotodocumentador (Vilber Loumart) (Figura 7).

Figura 7. Foto do gel de agarose a 2%, mostrando o tamanho dos fragmentos do gene

IL-23A amplificados pela PCR.

Pb = Pares de bases, Pd = padrão de massa, PR = promotora, EX = Exon.

4.4 - Sequenciamento automático

Apenas os produtos amplificados foram utilizados, obedecendo a critérios de fragmento de banda única e concentração na faixa de ≤ 20 ng/ μ L que foram estimadas pela comparação com fragmentos do marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™ Life Technologies, Brasil) em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. Posteriormente, 5 μ L do produto de amplificação foi submetido à purificação enzimática com a adição de 2 μ L da ExoSAP-IT – combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I (*USB Corporation – GE Healthcare*). O volume final de 7 μ L foi incubado a 37 °C por 15 minutos, para degradar o excesso de iniciadores e nucleotídeos, seguido por mais 15 minutos a 80 °C, para inativação da enzima. Decorrida essa etapa, os produtos da PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento. O protocolo consistiu na adição de: 1,5 μ L de “*Big Dye*” (ABI Prism® *BigDye*® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits – Applied Biosystems-Life Technologies), 0,5 μ L do iniciador a 10pMol (*Forward* ou

Reverse) com 6,0 μ L do Tampão “Save Money” (*Applied Biosystems Life Technologies*), obedecendo ao seguinte programa de ciclagem: 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos, num total de 25 ciclos, finalizado a 15 °C , no [Veriti® 96-Well Thermal Cyclers](#) (*Applied Biosystems - Life Technologies*). Estes produtos foram precipitados com EDTA (125 mM) / Acetato de Na (3M) / Ethanol PA (Merck Reagentes), de acordo com as recomendações da *Applied Biosystems - Life Technologies*.

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

4.5 - Ensaio de Genotipagem pelo TaqMan

O ensaio TaqMan® baseia-se na atividade exonuclease 5' $\rightarrow$ 3' da *Taq* DNA polimerase (enzima termoestável utilizada na amplificação de fragmentos de DNA com a técnica da PCR). Nessa técnica, ocorre a clivagem da ligação da sonda alvo específica que hibridiza com a cadeia complementar, criando um sinal de fluorescência. Na forma livre, a transferência de energia fluorescente ocorre de forma que a emissão pelo *reporter* (molécula formada por um fluoróforo de alta taxa de emissão fluorescente presente na região 5' da sonda) é absorvida pelo *quencher* (molécula que absorve a energia do fluoróforo em forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Quando ocorre a degradação da sonda pela atividade nuclease da enzima *Taq* DNA polimerase, durante a PCR, os corantes *reporter* e *quencher* são separados e a emissão de fluorescência do *reporter* não será mais absorvida pelo *quencher*, resultando em um aumento de emissão de fluorescência pelo *reporter* que será detectada e quantificada (Novais et al., 2004). A genotipagem de cada amostra é efetuada pela determinação da intensidade da fluorescência emitida. O aumento do sinal de fluorescência de um dos fluoróforos indica que um dos

alelos é homozigoto, sendo identificado conforme a cor da fluorescência utilizada na marcação do respectivo alelo. O aumento das duas cores será indicativo da presença de heterozigoto.

Protocolo da Reação e Ciclagem da Genotipagem

Para o ensaio de genotipagem da variante rs11171806, utilizou-se um volume final de 10 µL contendo: TaqMan genotyping master mix (2X) – 5,0 µL, Assay 20X – 0,5 µL, DNA genômico 1,0 µL, H₂O Milli-Q estéril – 3,5 µL, de acordo com o Protocolo do fabricante, Applied Biosystems. O ensaio foi realizado no equipamento *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*), com a seguinte ciclagem: 60° C por 1 minuto (pre-PCRread (Holding Stage) -Step1, 95°C por 10 minutos (Holding Stage- Step 1, 95°C por 15 segundos (40X) Cycling Stage - Step 1 e finalizando a 60°C por 1 minuto - Step 2.

4.6 - Avaliação Bioquímica

Glicemia

As amostras de sangue para a dosagem da glicose foram colhidas com o anticoagulante, fluoreto de sódio-EDTA. O método utilizado foi o enzimático-colorimétrico, específico para glicose: sistema (glicose oxidase-peroxidase), kit comercial LABTEST GOD-ANA (Brasil). Os valores de glicose foram considerados normais entre 70 a 99 mg/dL, no plasma em jejum (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, [Diabetes Care](#). 2003 Jan;26 Suppl 1:S5-20.).

Hemoglobina Glicada

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

Autoanticorpos pancreáticos: anticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD₆₅) e antiproteína homóloga à tirosino-fosfatase (anti-IA2)

As dosagens dos anticorpos anti-GAD e anti-IA2 foram realizadas por radioimunoensaio (RSR, UK), onde o antígeno recombinante (GAD₆₅ ou IA2) marcado com I125 foi incubado, à temperatura ambiente (para anti-GAD₆₅) e à 4°C (para anti-IA2) por 16 a 24 horas, com o soro a ser analisado. Os complexos antígeno-anticorpo formados foram tratados com suspensão de proteína A. O imunocomplexo marcado agregado foi separado por centrifugação e a quantificação de I125, presente no precipitado, contendo o imunocomplexo, foi efetuada em contador gama automático (Cobra II, Perkin-Elmer). A quantificação dos anticorpos foi realizada por extrapolação, a partir de curva padrão realizada no mesmo ensaio. Foram efetuadas curvas padrão com anti-GAD₆₅, com concentrações entre 0,1 U/mL a 300 U/mL, e com anti-IA2, entre 0,1 a 50 U/mL^{108,109}. O nível médio de anti-GAD₆₅ analisado em nosso laboratório em 787 indivíduos controles foi $0,11 \pm 0,46$ U/mL e os coeficientes de variação intra e interensaio foram de 3 e 5,5%, respectivamente.

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

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

Autoanticorpos extrapancreáticos:**Relacionados a outras doenças autoimunes**

anti-21 Hidroxilase (anti-21OH)

anticitoplasma de neutrófilo (ANCA)

fator antinúcleo (FAN)

fator reumatoide (FR)

antitireoperoxidase (anti-TPO)

antiendomísio (antiendom)

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

Foram utilizados reagentes para radioimunoensaio de procedência RSR. O soro foi incubado com o antígeno 21-OH hidroxilase recombinante, marcado com iodo radioativo, e o imunocomplexo obtido com proteína A foi separado por centrifugação. A concentração do autoanticorpo foi determinada pelas contagens radioativas do precipitado, em curva-padrão realizada no mesmo ensaio. Foi considerado normal ou negativo o valor menor ou igual a 1 UI/mL de unidade arbitrária.

Anticitoplasma de neutrófilo (ANCA)

O método utilizado foi a Imunofluorescência indireta em neutrófilos humanos de sangue periférico. Valor de referência: Negativo (não reagente).

Fator antinuclear (FAN)

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

1/40) para anticorpos antinucleares por IFI em HEp-2 foi titulado até 1/1.280. Valor de referência: Negativo (não reagente).

Fator reumatoide (FR)

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

Antitireoperoxidase (anti-TPO)

O método utilizado foi o Fluoroimunoensaio indireto com os reagentes da AutoDELPHIA. Valor de referência: < 35 U/mL.

Antiendomísio (antiendom)

O método utilizado foi a Imunofluorescência indireta em neutrófilos humanos de sangue periférico. Valor de referência: Negativo (não reagente).

IL-23

Para a determinação da concentração da IL-23, utilizou-se o Kit eBioscience – Human IL-23(p19/p40) Platinum ELISA. As placas utilizadas eram revestidas com anticorpo monoclonal específico para subunidade p19 humana da IL-23. Foram adicionados 100 µL de soro em duplicata nos poços apropriados durante 2 horas à temperatura ambiente. Após repetidas lavagens, as placas foram incubadas com biotina-anticorpo conjugado, durante 1 hora à temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com um total de 5 vezes antes de incubação durante 30 min com a enzima HRP-estreptavidina para o desenvolvimento de cor. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico de acordo com protocolo do fabricante e a densidade óptica foi determinada utilizando-se um leitor de placas Multiskan EX-Labsystems (Uniscience). Uma leitura de referência obtida a 450/630nm foi subtraída para formar as densidades ópticas. A concentração foi determinada por comparação com uma curva padrão.

4.7 - Análise Estatística

A construção do banco de dados e a análise estatística foram feitas no programa estatístico SPSS, versão 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ou o JMP package (versão 6.03, SAS Institute, Cary, NC, USA).

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

Para comparar as médias das variáveis independentes contínuas em relação aos grupos, foi realizado o Teste t Student para amostras independentes. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para estimar equilíbrio de Hardy-Weinberg. A diferença da frequência genotípica e alélica foi calculada pelo teste do Qui-Quadrado de Pearson (X^2), com cálculo dos respectivos odds ratio (OR) ou, quando necessário, o teste de Fisher.

Em toda a análise foi considerado um p valor padrão de 0,05 e intervalo de confiança de 95%.

O modelo de dominância com a presença ou ausência da variante para reduzir o número de classes e aumentar o poder estatístico da amostra foi utilizado na análise dos haplótipos das variantes descritas. Os haplótipos foram avaliados pelo Phase software, versão 2.1. A análise do desequilíbrio de ligação entre as variantes foi realizada pelo programa Cube X (Bristol Genetic Epidemiology Laboratories (BGEL) and MRC Centre for Causal Analyses in Translational Epidemiology (CAiTE), Department of Social Medicine, University of Bristol, UK). Para as frequências genotípicas, alélicas e de haplótipos, a significância do p foi corrigida pelo índice de Bonferroni de acordo com o número de *SNPs* estudados.

5.0 - Resultados

A amostra foi composta por 351 controles saudáveis e 370 pacientes portadores de DM1A.

Cerca de 60% dos pacientes com DM1A e 47% dos controles eram do sexo feminino.

Pacientes com DM1A tinham valores mais elevados de glicose, Hba1c, anticorpos anti-IA2 e anti-GAD₆₅ em relação aos controles. Apresentavam ainda menor idade e níveis séricos inferiores de peptídeo C ($p < 0,001$). A idade diagnóstica e a duração da doença foram $11,25 \pm 7,4$ e $10,2 \pm 9,87$ anos, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados clínicos e laboratoriais de pacientes com diabetes tipo 1 A e controles normais.

Variáveis	Grupos		p
	DM1A (n=370)	Controles (n=351)	
Idade (anos)	21,38 ±12,25	28,82 ±13,56	<0,001
Etnia			
Caucasoide	295 (79, 7%)	234 (68%)	<0.001
Outros	75 (20, 3%)	110 (32%)	
Gênero			
Masculino	143 (38, 6%)	186 (53%)	<0.001
Feminino	227 (61, 4%)	165 (47%)	
Glicose (mg/dl)	181,0 ±109,0	81,8 ±8,7	<0,001
Hba1c (%)¹	8,5 ±2,2	5,32 ±0,6	<0,001
Peptídeo C (U/mL)	0,41 ±0,3	2,68 ±1,4	<0,001
Anti-GAD₆₅ (U/mL)²	8,98± 20,4	0,09 ±0,4	<0,001
Anti-IA 2 (U/mL)³	4,99 ±11,7	0,08 ±0,17	<0,001
Duração do diabetes (anos)	10,2 +-9,87	-	-
Idade diagnóstica (anos)	11,25 ±7,4	-	-

1- Hba1c = hemoglobina glicada, 2-AntiGAD₆₅ (anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico), 3-Anti IA2(anticorpo antitirosina fosfatase).

Sequenciamento do Gene *IL23A*

No sequenciamento dos quatro exons do gene *IL-23A*, observou-se apenas uma variante no exon 3 (rs11171806). Nos demais 3 exons, tanto nos pacientes diabéticos quanto nos indivíduos controles, não houve nenhuma variação alélica, incluindo as descritas em banco de dados, apresentadas na tabela 4. Foi encontrada nova variante na região 5'

proximal no gene *IL-23A* em apenas um paciente diabético, descrita a seguir.

Tabela 3. Frequências genótípicas das variantes nas regiões codificadoras e 5' proximal do gene *IL-23A*.

Regiões	Polimorfismos	Genótipo/ Alelos	Frequência Genotípica Pacientes com DM1A n(%)	Frequência Genotípica Controle n(%)	OR (IC95%)	<i>p</i>
Região 5' proximal	rs 90401840 (T/A)	TT	93-(100)	91(100)		
	rs59094153 (A/C)	AA	93(100)	91(100)		
Exon 1	rs 11465744 (G/A)	GG	93(100)	91(100)		
	rs61937689 (C/T)	CC	93(100)	91(100)		
Exon 2	rs 11465746 (C/T)	CC	93(100)	91(100)		
	rs11727091 (G/C)	GG	93(100)	91(100)		
Exon 3	rs11171806 (G/A)	GG	80(86)	86(94,5)		
		GA	12(13)	5 (5,5)		
		AA	1 (1)	0 (0)		
Exon 4	rs13378047 (G/T)	GG	93(100)	91(100)		

Na região 5'proximal, identificou-se nova variante alélica em heterozigose c.-403(C>T) em uma paciente diabética do sexo feminino, 33 anos, com anticorpos anti GAD (41,5U/mL) e anti IA2 (9,4U/mL) positivos e 5 anos de duração da doença.

Análise realizada no TRANSFAC (<http://www.cbrc.jp/htbin/nph-tfsearch>) demonstrou que a troca do alelo (C>T) leva à perda de sítio de ligação para o fator de transcrição MZF1(*myeloid zinc finger 1*).

Figura 8 - Eletroferograma de parte do gene *IL-23A* (paciente controle).

Figura 9 - Eletroferograma de parte do gene *IL-23A*

Polimorfismos rs1171809 e rs2066808 do gene *IL23A*

Foi ampliado o estudo da única variante encontrada em região codificadora (rs11171806 G>A) em 370 pacientes e 314 controles e incluiu-se também a análise da rs2066808G>A, por genotipagem (Tabela 4). As duas variantes estavam em equilíbrio de Hardy Weinberg no grupo de controles e nos pacientes com DM1A.

A variante rs2066808 está localizada numa região intergênica entre o *locus* do gene *IL23A* e o do *STAT 2*.

No grupo controle, houve maior frequência do alelo G ($p=0,0026$) e dos genótipos (GG) ($p=0,013$) da variante rs 2066808 cuja significância estatística se manteve na frequência alélica após considerarmos o p utilizado pela correção por Bonferroni. ($p_c < 0,012$). A frequência alélica e

genotípica da variante rs11171806 do gene *IL-23 A* não diferiu entre pacientes e controles.

Tabela 4 - Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos rs11171806 e rs2066808.

Genótipos e Alelos	Pacientes		Controles		OR (CI 95%)	p
	n	%	n	%		
rs11171806						
GG	344	93,0	297	94,6	0,76 (0,40–1,42)	0,43
GA/AA	26	7,0	17	5,4		
G	690	96,5	610	97,1	0,75 (0,41–1,38)	0,47
A	27	3,5	18	2,9		
rs2066880						
AA	265	75,7	232	66,1	0,65 (0,46-0,92)	0,013
AG	77	22,0	103	29,3		
GG	8	2,3	16	4,6		
G	93	13,3	135	19,8	0,64(0,48-0,86)	0,0026
A	607	86,7	567	80,2		

Os alelos G dessas duas variantes estiveram em forte desequilíbrio de ligação ($D' = -0.825$ para controles, $p < 2.0 \times 10^{-6}$ e $D' = -0.902$, $p < 2.0 \times 10^{-17}$ para pacientes). Em virtude disso, estudaram-se os haplótipos desses *SNPs*.

Frequência dos Haplótipos (rs2066808 e rs11171806) do gene *IL23A*

Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa dos haplótipos e correspondentes genótipos para os SNPs rs2066808 e rs11171806 do gene *IL23A*.

Haplótipos	Controles (%)	Pacientes(%)	Total (%)
(AA/AG)	16(2,93)	26(4,10)	42 (3,56)
GA	439 (80,40)	584 (86,43)	987 (83,64)
GG	91 (16,67)	60 (9,46)	151 (12,80)

G=14.31, p=0,0008

Genótipos dos haplótipos	Controles (%)	Pacientes (%)	Total (%)
(AA,AG)/(AA,AG)	1 (0,37)	1 (0,32)	2 (0,34)
(AA,AG)/GA	10 (3,66)	23 (7,26)	33 (5,59)
(AA,AG)/GG	4 (1,47)	1 (0,32)	5 (0,85)
GA/GA	180 (65,93)	238 (75,08)	418 (70,85)
GA/GG	69 (25,27)	49 (15,46)	118 (20,00)
GG/GG	9 (3,30)	5 (1,58)	14 (2,37)

Os genótipos dos haplótipos encontrados estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo dos controles ($X^2 = 0.075$, 3 d.f., $p = 0.89$) e na amostra dos pacientes ($X^2 = 3.27$, 3 d.f., $p = 0.35$). Para comparar a frequência dos haplótipos entre pacientes e controles, os haplótipos AG e AA foram unidos em uma única classe (AA/GG), evitando classes com pequeno número de indivíduos que poderiam invalidar o teste. Após isso, a hipótese de frequência similar entre controles e diabéticos foi rejeitada pelo teste de razão de verossimilhança ($G = 14,31$, $p = 0.0008$). Para testar a diferença da frequência dos haplótipos entre pacientes e controles, estes foram unidos em 3 diferentes esquemas, também para evitar grupos reduzidos: presença/ausência dos haplótipos (AA/AG), GA e GG. O resultado é mostrado na tabela 6. Apenas a presença mais frequente do haplótipo (GG) no grupo controle (16,7% x 9,5%) pode ser considerada

significativa após a correção de Bonferroni ($p_c = 0.0009$, Fisher test, OR = 0.53)

Tabela 6 - Haplótipos no *locus* do gene da IL-23A em pacientes DM1A e controles

Haplótipos	Controles		Pacientes		G	$p(G)$, (Fisher)
	Presente	Ausente	Presente	Ausente		
(AA/AG)	15	258	25	292	0,25	0,25 (0,32)
(GA)	14	259	7	310	3,67	0,055 (0,074)
(GG)	82	191	55	262	13,2	0,0003 (0,0003)*

* $p < 0.001$, após correção pelo índice de Bonferroni

A frequência do haplótipo GG diferiu entre o grupo de etnia caucasoide em relação a outras etnias ($p < 0.0001$), na análise incluindo controles e pacientes DM1A (Tabela 7). Entretanto, após a regressão logística nominal ajustada para a presença ou ausência do haplótipo GG e separação dos grupos étnicos entre pacientes e controles, a contribuição da etnia não permaneceu ($p = 0,16$), ao passo que a presença do haplótipo GG persistiu com grande influência ($p = 0,006$). Esses dados evidenciaram que o haplótipo GG atuou independente da etnia.

Tabela 7 - Frequência absoluta e relativa do haplótipo GG nos grupos étnicos.

Ancestralidade	GG ausente	GG presente
Européia	362 (82%)	80 (18%)
Outras	87 (61%)	55 (39%)

Variantes rs11209026 e rs10889677 do gene *IL-23R*

Não houve diferença nas frequências alélicas e genotípicas das variantes rs11209026 e rs10889677 entre pacientes DM1A e controles (Tabela 8).

Tabela 8.- Frequência alélica e genotípica das variantes do gene *IL-23R* em pacientes DM1A e controles.

Variantes	DM1A		Controles		OR (IC95%)	p
	n	%	n	%		
rs11209026						
GG	301	90,3	348	91,1	0,94(0,57-1,56)	0,93
AG/AA	32	9,7	35	8,9		
G	633	95	731	95,4	0,91(0,56-1,49)	0,82
A	33	5	35	4,6		
rs10889677						
CC	159	49,1	158	53,9	0,82(0,59-1,13)	0,26
AC/AA	165	50,9	135	46,1		
C	456	70,3	422	72	0,92(0,72-1,18)	0,56
A	192	29,7	164	28		

Concentrações da IL-23 no grupo de pacientes DM1A e controles

As concentrações séricas da IL-23 em 135 pacientes portadores de DM1A foram semelhantes às de 112 controles (Tabela 9). Também não houve diferença entre os grupos, quando analisamos apenas pacientes com duração de doença inferior a 2 anos em relação aos controles.

Tabela 9 - Concentrações séricas da IL-23 em pacientes e controles

	IL-23(pg/mL) (média ± DP)	<i>p</i>
DM1A	5,65 ± 14	0,18
DM1A < 2 anos de duração	4,65 ± 6,94	0,08
Controles	9,06 ± 23,74	

Efeitos do Haplótipo GG das variantes do gene *IL-23A* rs2066808 e rs11771806 nas variáveis laboratoriais.

A presença do haplótipo GG dos *SNPs* rs2066808 e rs11171806 não influenciou na frequência dos autoanticorpos pancreáticos e extrapancreáticos ou dos níveis de peptídeo C e IL-23 (Tabela 10).

Tabela 10 - Influência do haplótipo GG das variantes rs2066808 e rs11171806 do gene *IL-23A* nos autoanticorpos, concentrações de peptídeo C e de IL-23.

Parâmetros	GG	Outros	OR	IC (95%)	p
Peptídeo C >0,5ng/dL	9 (21,9%)	32 (18,9%)	1,2	0,52-2,77	0,66
<0,5ng/dl	32 (78,1%)	137 (81,1%)			
Anti-GAD ₆₅ positivo	20 (37,3%)	118 (47,4%)	0,67	0,36-1,23	0,2
negativo	33 (62,7%)	131 (52,6%)			
IL-23(pg/mL)	5,73±9,8	6,39±16,6			0,74
(média±DP)					
Anti-21OH positivo	2 (3,6%)	6 (3,7%)	0,97	0,19-4,97	1
negativo	54 (96,4%)	158 (96,3)			
Anti-TPO positivo	21 (21,4%)	56 (19,8%)	1,1	0,62-1,94	0,77
negativo	77 (78,6%)	227 (80,2%)			
ANCA positivo	0 (0%)	3 (3,1%)	0		1
negativo	23 (100%)	93 (96,9%)			
Antiendomísio positivo	2 (7,2%)	4(4,2%)	1,75	0,3-10,0	0,61
negativo	26 (92,8%)	91(95,8%)			
FAN positivo	10 (16,4%)	33 (20%)	0,78	0,36-1,70	0,70
negativo	51 (83, 4%)	132 (80%)			
FR positivo	0 (0%)	4 (2,6%)	0	-	0,57
negativo	54 (100%)	151 (97,4%)			

6.0 - Discussão

A maioria das doenças autoimunes surge através de vias inflamatórias específicas, mas muitas destas podem ser compartilhadas entre elas. A identificação dos mecanismos que controlam estas vias, incluindo seus determinantes genéticos, poderá auxiliar na abordagem terapêutica destas enfermidades^{60, 61}.

O DM1A se caracteriza pela infiltração nas ilhotas pancreáticas de vários tipos de células inflamatórias, orquestradas por citocinas ainda não totalmente caracterizadas nos seres humanos. A destruição das células beta está fortemente relacionada à ativação da via linfocitária Th1. A IL-12, ativadora da via Th1, é considerada importante determinante do DM 1A. Variantes do gene IL-12 p40 têm sido associadas ao diabetes, à gravidade de suas manifestações e à idade precoce do diagnóstico^{62,63}.

Entretanto, apesar da forte ligação da IL-12 com doenças autoimunes, vários trabalhos demonstraram que esta não as explicavam totalmente. Assim, em modelos animais de encefalomielite autoimune, condição considerada como dependente da ativação pela IL-12, o bloqueio desta citocina não interferiu no desenvolvimento da doença⁶⁴.

A descoberta da IL-23 favoreceu a compreensão de vários mecanismos determinantes de autoimunidade. A IL-23 compartilha a subunidade p40 com a IL-12 e, estudos que neutralizavam esta subunidade, definiram importantes diferenças entre as duas citocinas. Camundongos deficientes da subunidade p 19 (específica da IL-23) e não na p35 (relacionada à IL-12), foram resistentes ao desenvolvimento da artrite induzida pelo colágeno, evidenciando a participação da IL-23 na fisiopatologia desta enfermidade⁶⁵. Na lesão psoriática, a expressão do RNA mensageiro das duas subunidades era superior à da pele sã, mas a da subunidade p 19 da IL23 era maior que a da p40⁶⁶⁻⁶⁷.

Estudos recentes evidenciaram a participação da via Th17 na fisiopatologia do diabetes autoimune, mas nenhum analisou o papel da IL-23, citocina implicada na ativação desta via, na manifestação da doença.

Nossos dados sugerem a associação do gene *IL-23 A* na susceptibilidade ao DM1 em humanos.

Através do seqüenciamento das regiões codificadoras do gene *IL-23 A*, identificamos apenas uma variante (rs11171806 A>G) no exon 3, das seis descritas em bancos de dados (*Ensembl genome browser* e *NCBI db SNP*). Esta variante não leva à alteração na estrutura da proteína codificada.

Identificamos uma nova variante na região 5' proximal c.-403 C>T em paciente diabética do sexo feminino, 33anos, com anticorpos anti-GAD65 e anti IA2 positivos e 5 anos de duração de diabetes. Através do site TRANSFAC (<http://www.cbrc.jp/htbin/nph-tfsearch>), notamos que a troca a C>T implicava na perda de um sítio de ligação do fator de transcrição MZF (*myeloid zinc finger 1.*) cuja expressão celular resulta em câncer e, possivelmente, não está relacionado com a predisposição ao diabetes autoimune.

A pequena frequência de variantes polimórficas, em concordância com dados da literatura, e a ausência de variantes determinantes de mudanças estruturais na proteína, sugerem a importância da função biológica da *IL-23*.

A frequência do alelo G da única variante da região codificadora do gene *IL-23 A*, rs11171806, foi de 96,5% nos pacientes com diabetes e 97,1% nos controles, $p=0,47$. Considerando os recentes estudos implicando outros *loci* do gene *IL-23 A* em várias doenças autoimunes, ampliamos nossa avaliação incluindo o *SNP* (rs2066808G>A), de predisposição à artrite psoriática⁶⁸ O alelo G prevaleceu no grupo controle (19,8%) em relação aos pacientes DM1 (13,3%), conferindo proteção ao diabetes ($p=0.0026$ -significativo após correção por Bonferroni; $pc<0.012$).

Este polimorfismo está presente na região 3'UTR do gene *IL-23A* e na região intrônica do gene *STAT 2*. A sinalização da *IL-23* envolve *STAT 1*, *STAT3* e *STAT4*, mas não o *STAT2*, sugerindo que este *SNP* exerce eventual efeito na expressão do gene da *IL-23A* ou em outras vias inflamatórias nas quais a *STAT 2* desempenha algum papel. De acordo com *Ensembl genome browser*, não há estudos que evidenciem a influência

deste *SNP* na regulação da expressão do gene *IL23A* ou *STAT2*. Entretanto, na troca do G por A desta variante no site TRANSFAC (<http://www.cbrc.jp/htbin/nph-tfsearch>), que identifica sítio de ligações de fatores de transcrição em regiões promotoras, verifica-se o desaparecimento do sítio de ligação do I κ -2. Os Ikaros são fatores de transcrição presentes nos linfócitos, que atuam como moduladores de outros fatores de transcrição⁶⁹, ainda não totalmente estabelecidos, e na expressão de proteínas como os receptores dos linfócitos T. A perda do sítio de ligação do I κ -2 na região intrônica do gene *STAT 2* poderia, assim, influir na expressão deste gene e função dos linfócitos T.

Verificamos, a seguir, que as variantes rs11171806 e rs2066808 do gene *IL-23A* estavam em forte desequilíbrio de ligação, justificando a análise dos seus haplótipos. O haplótipo GG predominou nos controles (16,7 %) em relação aos pacientes DM1 (9,5 %), ($p_c=0.0009$, Fisher test, OR = 0.53), evidenciando o efeito do haplótipo GG das variantes rs11171806 e rs2066808 na proteção ao DM1. Este achado nos levou a pesquisar se a presença do haplótipo GG poderia implicar em diferente fenótipo dos pacientes com DM1. No entanto, o haplótipo GG não influenciou na frequência dos auto-anticorpos pancreáticos, nem nas concentrações séricas da IL-23 ou na presença de peptídeo C residual, mesmo considerando apenas os pacientes com diabetes recente, com menos de dois anos de duração. De forma semelhante, a presença do haplótipo GG não repercutiu na frequência de autoanticorpos extra-pancreáticos.

Uma preocupação presente nos estudos da população brasileira é a sua grande miscigenação. De fato, verificamos que a frequência do haplótipo GG foi menor no grupo de etnia caucasóide (18%) em relação a outras etnias (39%) ($p<0,0001$), na análise que incluiu controles e pacientes DM1A. Entretanto, após a regressão logística nominal, ajustada para a presença ou ausência do haplótipo GG, e a separação dos grupos étnicos entre pacientes e controles, a contribuição da etnia não permaneceu ($p=0,16$), ao passo que a presença do haplótipo GG persistiu com grande influência ($p=0,006$). Estes dados evidenciaram que o haplótipo GG atuou independente da etnia.

Nenhum destes polimorfismos induz alteração na estrutura da proteína IL- 23, mas a variante rs2066808, presente na região intrônica poderia alterar a expressão do gene, atuando na estabilidade do RNA mensageiro e interferindo na sua função. No entanto, não podemos afastar a possibilidade das variantes GG não serem as reais determinantes da proteção ao DM1, mas estarem em desequilíbrio de ligação com outra variante, em sítios de regulação envolvidos na expressão da IL-23 ainda não identificados.

Em relação aos polimorfismos rs11209026G>A e o rs10889677C>A do gene *IL-23R*, já descritos como predisponentes de outras doenças autoimunes⁷⁰⁻⁷², não verificamos qualquer influência na susceptibilidade ao diabetes autoimune. A variante presente na região intrônica, rs10889677 (*IL-23R*), poderia atuar alterando a estabilidade do RNA mensageiro do *IL23R*. Já o alelo de risco A da variante rs11209026 (*IL-23R*), que codifica aminoácido da porção intracitoplasmática deste receptor, aumenta a sua atividade⁷³, o que o torna mais propenso a desencadear a resposta inflamatória. No entanto, o papel destes polimorfismos na autoimunidade ainda reque melhor definição. Outros autores também não os evidenciaram como de risco para doença autoimune tireoidiana⁷⁴, ou lúpus eritematoso sistêmico⁷⁵ em populações asiáticas, sugerindo talvez influências regionais ou populações específicas. O alelo A da variante rs11209032 do gene *IL-23R* conferiu risco para a espondilite anquilosante⁷⁰ e para a presença do anticorpo antitopoisomerase na esclerose sistêmica. Já seu genótipo ancestral (GG), foi associado à proteção contra o desenvolvimento de hipertensão pulmonar⁷¹. Na população chinesa, a variante rs11209032, genótipo AA, foi mais frequente nos pacientes com doença de Behçet⁷².

Complementando a avaliação dos efeitos da IL-23 no diabetes autoimune, determinamos as suas concentrações séricas. Estas não diferiram significativamente entre os grupos, mesmo quando analisamos apenas a população de pacientes com diabetes recente.

A concentração sérica da IL-23 está aumentada em várias doenças autoimunes sistêmicas. Em estudo envolvendo pacientes com polimiosite, a

IL-23 estava elevada no soro destes pacientes, principalmente nos com menor duração da doença⁷⁶. Na artrite reumatóide em atividade, observou-se maior concentração sérica da IL-23 e IL-17 do que nos indivíduos saudáveis⁷⁷. Mohammad M et al.⁷⁸ demonstraram que as concentrações sanguíneas da IL-23 estavam mais elevadas nos portadores de colite ulcerativa em atividade do que numa população controle saudável e que havia aumento progressivo da interleucina, na medida que se agravava a doença. Esses estudos atestaram a influência desta interleucina nos processos inflamatórios.

Uma possibilidade para os nossos achados é que estamos analisando o sangue periférico, que não necessariamente expressa o processo imune que está ocorrendo no pâncreas. Ferraro A et al⁷⁹ evidenciaram claramente que havia aumento da população das células Th17 apenas nos linfonodos peripancreáticos de pacientes diabéticos submetidos a transplante pancreático e não no sangue periférico. Como a IL-23 age, principalmente, na expansão dos linfócitos Th17, talvez sua expressão esteja elevada somente nas ilhotas de Langerhans e tecidos de drenagem linfática locais.

Desta forma, nossos resultados sugerem que o *locus* do gene *IL23A*, através dos alelos G das variantes rs2066808 e rs11171806, está associado à proteção ao DM1A. Já as variantes do gene *IL23R*, rs11209026 e rs10889677, não se relacionaram com predisposição ao DM1A na nossa amostra. As concentrações da IL-23 não diferiram entre os grupos de pacientes com DM1A e indivíduos controles.

7.0- Conclusões

- Apenas uma variante, rs11171806G>A, foi observada nas regiões codificadoras do gene IL-23 A
- Identificamos nova variante na região 5' proximal c.-403 C>T em apenas uma paciente com diabetes tipo 1 autoimune
- O haplótipo GG das variantes rs2066808G>A e rs11171806G>A do gene *IL23A* foi associado a proteção ao DM1A
- As concentrações da IL-23 não diferiram nos pacientes com DM1A em comparação com os controles
- As variantes rs11209026 e 10889677 do gene *IL23R* não apresentaram associação com DM1A.

8.0-Anexos

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 02/04/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0125/08**, intitulado: **"PRESENÇA DE MUTAÇÕES E/OU POLIMORFISMOS NO GENE DA INTERLEUCINA 23 (IL-23) EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELITUS TIPO 1 AUTOIMUNE"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

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

Pesquisador (a) Executante: **VINÍCIUS SILVA COSTA**

CAPPesq, 06 de maio de 2008

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovidio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069

6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:

SEXO : M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO:

BAIRRO:

CEP:

Nº:

APTO:

CIDADE:

TELEFONE: DDD ()

2-RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :

SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO:

BAIRRO:

CEP:

Nº:

APTO:

CIDADE:

TELEFONE: DDD ()

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Associação do gene IL23A com a proteção ao diabetes mellitus tipo 1 autoimune

2. PESQUISADOR: Maria Elizabeth Rossi da Silva

CARGO/FUNÇÃO: Médica pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº CRM 19.981

UNIDADE DO HC-FMUSP: LIM 18-FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐
MÉDIO ☐

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO

RISCO BAIXO ☒

RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa: Avaliar a influência de variantes do gene IL23A e do gene IL23R no diabetes tipo 1 autoimune.
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: - no início e final do estudo será puncionada uma veia em seu antebraço e coletado exame de sangue.
3. desconfortos e riscos esperados:
 - A - Você poderá apresentar dor ou hematoma no local da coleta de sangue.
 - B - O uso da insulina poderá levar a queda das taxas de açúcar no sangue (hipoglicemia) que pode provocar tontura, excesso de transpiração (suor), tremores e coração acelerado.
4. benefícios que poderão ser obtidos: Com a sua participação no estudo, você nos ajudará a melhorar o tratamento para diabéticos do tipo 1.
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:
 - Você receberá informações sobre dieta para ajudar no controle do seu peso e do seu diabetes.
 - Você aprenderá a controlar melhor o seu diabetes através do empréstimo de aparelhos para testar o nível de açúcar no sangue em casa. Será ensinado como utilizar o aparelho e as medidas da glicose no sangue serão realizadas em 6 períodos do dia (antes e 2 horas após o café, almoço e jantar) todos os dias da semana. A cada 15 dias, este controle será revisado com o seu médico.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

- Quando quiser, O Sr ou Senhora poderá ter acesso às informações sobre os exames a que será submetido, saber sobre os riscos e benefícios relacionados ao nosso estudo e tirar qualquer dúvida.
- O Sr ou Senhora, poderá retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar da pesquisa, sem prejudicar o seu acompanhamento na Unidade de Diabetes.
- O Sr ou Senhora terá garantia de sigilo e privacidade
- O Sr ou Senhora terá assistência médica garantida na Unidade de Diabetes e laboratório de Carboidratos da Disciplina de Endocrinologia do HC/FMUSP, por eventuais danos à saúde decorrentes do nosso estudo.
- Não haverá indenização por eventuais danos à saúde decorrentes do nosso estudo

9.0 Referências

1. Pugliese A, Einsenbarth GS. Type 1 Diabetes Melitus of Man: Genetic Susceptibility and Resistance. *Adv Exp Med Biol.* 2004; 552:170-203
2. Kunihiro I, Eiji K, Katsumi E. Recent Advancement of Understanding of Type 1 Diabetes and Potential Relevance to Diabetic Nephropathy. *Am.Journal of Nephrology.* 2007; 27:554-564
3. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N.Engl.J.Med.* 2002; 347:911-920
4. Dahlquist GG, Patterson C, Soltesz G. Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetes Care.* 1999; 22(10):1698-702
5. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA, Hilton DA. A search for evidence of viral infection in pancreases of newly diagnosed patients with IDDM. *Diabetologia.* 1997; 40(1):53-61
6. Hyty H, Hiltunen M, Knip M, Laakkonen M, Vhsalo P, Karjalainen J, Koskela P, Roivainen M, Leinikki P, Hovi T. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes.* 1995; 44(6):652-7
7. Craig, ME, Rawlinson WD, Yeung WCG. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ.* 2011; 342:1-9
8. Burgess MAS, Forrest JM. Congenital rubella and diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2009; 52:369-370
9. Calcinaro F et al. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia.* 2005; 48:1565-1575.
10. Study design of the Trial to Reduce IDDM on the Genetically at Risk (TRIGR). *Pediatr Diabetes.* 2007; 8:117-137

11. Klemetti P, Savilahi E, Ilon J, Akerblom HK, Vaarala O. T-cell reactivity to wheat glúten in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Immunol.* 1998;47:48-53
12. Mathieu C et al. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia.* 2005;48:1247-1257
13. Von Herrath M, Sanda S, Herold K. Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease?. *Nat Rev. Immunol.* 2007;7: 988-991
14. Karlsen, AE; Dyrberg, T. Molecular mimicry between non-self, modified self and self in autoimmunity. *Semin Immunol.* 1998; 10:25-34.
15. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes.* 2005; 54 Suppl 2:S52-61.
16. Park Y. Functional evaluation of the type 1 diabetes (T1D) susceptibility candidate genes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 77 (Suppl 1):S110-5.
17. Wenzlau JM, Moua O, Sarkar SA, et al. S1C30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. *Ann NY Acad Sci* 2008;1150:256–259.
18. Davini E et al. O genótipo I/II do locus VNTR do gene da insulina confere risco independente para diabetes mellitus tipo 1 nos pacientes sem os genótipos DRB1 e DQB1 de susceptibilidade. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia.* 2005; 49(Suppl 2):S876.
19. Bingley PJ, Bonifacio E, Williams AJK et al. Prediction of IDDM in the general population. Strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes.* 1997; 46: 1.701- 10.
20. Alves C et al. Importancia do sist de histocompatibilidade humano(HLA) em pediatria-*Pediatria.* 2005; 27:274-286.
21. Fernandes APM et al. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes Endócrinas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia.* 2003; 47: 601-611.
22. Van Rood JJ. The impact of the HLA-system in clinical medicine. *Shweiz Med Wschr* 1993; 123:85-92.
23. Kelly MA et al. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol.* 2003; 56:1-10.

24. Alves C et al. Distribuição e frequência dos alelos e haplótipos HLA em brasileiros com diabetes mellito tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2006;60:436-44.
25. Boyman O, Purton JF, Surth CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Current Opin Immunol*. 2007; 19:320-326.
26. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
27. Thornton AM, Shevach EM. CD4 + CD25 + immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998; 188:287–96.
28. Elson CO et al. Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in T cell-mediated model in mice. *Gastroenterology*. 2007; 132:2359-2370.
29. Kingston HGM. Induction function and regulation of IL-17 producing T cells. *Eur. J. Immunology*. 2008; 38:2636-2649.
30. Langrish CL et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med*. 2005;205:233-24.
31. Lynette A. Fouser, Jill F. Wright, Kyriaki Dunussi-Joannopoulos, Mary Collins. Th 17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunological Reviews*. 2008;226:87-102.
32. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. IL17 produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J. Immunol*. 2003; 170:2106-2112.
33. Annunziato F et al. Phenotypic and functional features of human Th 17 cells. *J. Exp. Med*. 2007;204:1849-1861
34. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores RL, Ait YS, Maat CPJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S et al. T cell interleukin induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996; 183:2593-2603.
35. Lankford CS, Frucht DM. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *J Leukoc Biol*. 2003; 73:17-23.

- 36.** Yao Z, Painter FWC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ, Cutting E. Human IL-17: A novel cytokine derived from Tcells. *J Immunol.* 1995;155:5483-5486.
- 37.** Sarah L Gaffen. Biology of recently discovered cytokines: Interleukin-17-a unique inflammatory cytokine with roles in bones biology and arthritis. *Arthritis Research and Therapy* . 2004; 6:240-247.
- 38.** Anders Lindén. A role for cytoplasmatic adaptor protein Act-1 in mediating IL-17 signaling. *Science* . 2007; 398:1-8.
- 39.** Lankford CS, Frucht DM. A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. *J Leukoc Biol.* 2003;73:17-23.
- 40.** McKenzie BS, Kastelen RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 2006 Jan;27(1):17-23
- 41.** Stark MA et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. 2005;222:85-294.
- 42.** Thomas K, Estelle B, Mohamed O, Vijay KK. IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology.* 2009;27:485-517.
- 43.** Suarez Pinzon WL, Rabinovitch A. Approaches to type 1 diabetes prevention by intervention in cytokine immunoregulatory circuits. *Int J Exp Diabetes Res.* 2001;2:3-17.
- 44.** Vukkadapu SS, Belli JM, Ishii K, Jega AG, Hutton JJ, Aronow BJ, Katz JD. Dynamic interaction between T-cell mediated beta-cell damage and beta-cell repair in the run up to autoimmune diabetes of the NOD mouse. *Physiol Genomics* .2005; 21:201-211.
- 45.** Jain R, Tartar DM, Gregg RK, Divekar RD, Bell JJ, Lee HH, Yu P, Ellis JS, Hoeman CM, Franklin CL, Zagahounani H . Innocuous IFN gamma induced by adjuvant free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. *J Exp Med.* 2008; 205:207218.
- 46.** Bradshaw ME, Raddassi K, Elyaman W, Tiihamer O, Gottlieb AP, Kent CS, Hafler AD. Monocytes from Patients with Type 1 Diabetes Spontaneously Secret Proinflammatory Cytokines Inducing Th 17 Cells. *The Journal of Immunology.* 2009;183:4432-4439.

- 47.** Arif S et al. Peripheral and Islet Interleukin-17 Pathway Activation Characterizes Human Autoimmune Diabetes and Promotes Cytokine-Mediated β -Cell Death. *Diabetes*.2011; 60:2112-2119.
- 48.** Mensah B et al.New Member of the Interleukin-12 Family of Cytokines: IL-23 and IL-27 Modulate Autoimmune Diabetes.*Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006; 1079:157-160.
- 49.** Wang M, Yang L, Sheng X, Chen W, Tang H, Sheng H, Xi B, Qin Zang Y. T-cell vaccination leads to suppression of intrapancreatic Th17 cells through Stat3-mediated ROR γ t inhibition in autoimmune diabetes. *Cell Res.* 2011 Apr 26.
- 50.** Kotake S et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 1999; 103:1345-1352.
- 51.** Hwang SY, Kim JP, Park MK, Moon Y, Kim WU, Kim HY. IL-17 induce production of IL-6 and IL-18 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-Kappa Beta and PI-3Kinase/AK 1-dependent pathways.*Arthritis Res Ther.*2004;6:120-128.
- 52.** Melis L, Vandooren B, Kruithof E, Jacques P, De Vos M, Mielants H, Verbruggen G, De Keyser F, Elewaut D. Systemic levels of IL-23 are strongly associated with disease activity in rheumatoid arthritis but not spondyloarthritis.*Ann Rheum Dis.* 2010 Mar; 69(3):618-23.
- 53.** Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD.The IL-23/Th17 axis:therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2006 Dec; 18(6):670-5.
- 54.** Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, Gudjonsson JE, Li Y, Tejasvi T, Feng BJ, Ruether A, Schreiber S, Weichenthal M, Gladman D, Rahman P, Schrodi SJ, Prahalad S, Guthery SL, Fischer J, Liao W, Kwok PY, Menter A, Lathrop GM, Wise CA, Begovich AB, Voorhees JJ, Elder JT, Krueger GG, Bowcock AM, Abecasis GR; Collaborative Association Study of Psoriasis.Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kB pathways. *Nat Genet.* 2009 Feb; 41(2):199-204.

- 55.** Nair RP, Ruether A, Stuart PE, Jenisch S, Tejasvi T, Hiremagalore R, Schreiber S, Kabelitz D, Lim HW, Voorhees JJ, Christophers E, Elder JT, Weichenthal M. Polymorphisms of the IL12B and IL23R Genes Are Associated With Psoriasis *J Invest Dermatol*. 2008 Jul; 128(7):1653-61.
- 56.** Huber AK, Jacobson EM, Jazdzewski K et al. Interleukin(IL)-23 Receptor is a major susceptibility gene for Graves Ophthalmopathy: The IL-23/T-helper 17 axis Extends to thyroid autoimmunity *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(3):1077-1081.
- 57.** Monteleone I et al. Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa. *J Immunol*. 2010 Feb 15; 184(4):2211-8.
- 58.** Mei Y et al. Increasing serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clin. Rheumatol*. 2010; 10:1647-51.
- 59.** Larsen JM, Bonefeld CM, Poulsen SS, Geisler C, Skov L. IL-23 and T (H) 17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Feb; 123(2):486-92.
- 60.** Gourh P, Tan FK, Assassi S, Ahn CW, McNearney TA, Fischbach M, et al. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with anti-topoisomerase I and anticentromere antibody-positive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2006; 54:3945–53.
- 61.** Alkassab F, Gourh P, Tan FK, McNearney T, Fischbach M, Ahn C, et al. An allograft inflammatory factor 1 (AIF1) single nucleotide polymorphism (SNP) is associated with anticentromere antibody positive systemic sclerosis. *Rheumatology* 2007; 46:1248–51.
- 62.** Altinova AE ET al. Association of polymorphisms in the IL-18 and IL-12 genes with susceptibility to Type 1 diabetes in Turkish patients. *J Endocrinol Invest*. 2010 Jul-Aug; 33(7):451-4.
- 63.** Morahan G, McKinnon E, Berry J, Browning B, Julier C, Pociot F, James I. Evaluation of IL12B as a candidate type I diabetes susceptibility gene using data from the Type I Diabetes Genetics Consortium. *Genes Immun*. 2009 Dec; 10 Suppl 1:S64-8.
- 64.** Boniface K et al. From IL-23 to T- helper 17 cells: Human T –helper differentiation revisited. *Immunological Review*. 2008; 228:132-146.

- 65.** Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2003; 198:1951–7.
- 66.** Lee E et al. Increased Expression of Interleukin 23 p19 and p40 in Lesional Skin of Patients with Psoriasis Vulgaris, *J. Exp. Med*. 2004; 199:125-130.
- 67.** Di Meglio P et al The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PLOS One*. 2011 Feb 22; 6(2):e17160.
- 68.** Bowes J, Orozco G, Flynn E, Ho P, Brier R, Marzo-Ortega H, Coates L, McManus R, Ryan AW, Kane D, Korendowych E, McHugh N, FitzGerald O, Packham J, Morgan AW, Bruce IN, Barton A. Confirmation of TNIP1 and IL23A as susceptibility loci for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Sep; 70(9):1641-4.
- 69.** Molnár A, Georgopoulos K. The Ikaros Gene encodes a Family of Functionally Diverse Zinc Finger DNA-Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 1994; 14:8292-8303.
- 70.** Duan Z et al Interleukin-23 receptor genetic polymorphisms and ankylosing spondylitis susceptibility: a meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2011 Jan 21.
- 71.** Agarwal SK, Gourh P, Shete S, Paz G, Divecha D, Reveille JD, Assassi S, Tan FK, Mayes MD, Arnett FC. Association of interleukin 23 receptor polymorphisms with anti-topoisomerase-I positivity and pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2009 Dec; 36(12): 2715-23.
- 72.** Yang P, Hou S, Du L, Xie L, Zhou H, Kijlstra A. IL-23R gene confers susceptibility to Behcet's disease in a Chinese Han population. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jul; 69(7):1325-8.
- 73.** Capon F, Di Meglio P, Szaub J et al. Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. *Hum Genet*. 2007; 122:201–6.

- 74.** Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Nakano Y, Yoneyama K, Ban Y, Hirano T. Association studies of the IL-23R gene in autoimmune thyroid disease in the Japanese population. *Autoimmunity*. 2009 Feb; 42(2):126-30.
- 75.** Li Y et al. The Association between Interleukin-23 Receptor Gene Polymorphisms and Systemic Lupus Erythematosus. *DNA AND CELL BIOLOGY*. 2010; 29:79-82.
- 76.** Shen H, Xia L, Lu J, Xiao W. Interleukin-17 and interleukin-23 in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Scand J Rheumatol*. 2011 ;40(3):217-20.
- 77.** Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC, Lan JL. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF- α therapy. *Arthritis Res Ther*. 2011; 13(4):R126.
- 78.** Mohammad M et al. Serum Interleukin-23 levels in patients with ulcerative colitis. *Iran J Immunol*. 2011; 8:183-188.
- 79.** Ferraro A et al. Expansion of Th17 Cells and Functional Defects in T Regulatory Cells Are Key Features of the Pancreatic Lymph Nodes in Patients With Type 1 Diabetes. *DIABETES*. 2011;60:2903-13).