MÁRCIA REGINA BEDIN

Associação dos polimorfismos -318C/T, CT60 e A49G do gene *CTLA4,* R620W do gene *PTPN22* e A946T do gene *IFIH1* em pacientes pediátricos com doença autoimune tireoidiana e diabetes mellitus tipo 1

São Paulo

2013

MÁRCIA REGINA BEDIN

Associação dos polimorfismos -318C/T, CT60 e A49G do gene *CTLA4*, R620W do gene *PTPN22 e* A946T do gene *IFIH1* em pacientes pediátricos com doença autoimune tireoidiana e diabetes mellitus tipo 1

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

Programa de Pediatria

Orientadora: Dra. Suemi Marui

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

Dados Internacionais de Catalogação Pública (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bedin, Márcia Regina
Associação dos polimorfismos -318C/T, CT60 e A49G do gene CTLA4, R620W do gene PTPN22 e A946T do gene IFIH1 em pacientes pediátricos com doença autoimune tireoidiana e diabetes mellitus tipo 1 / Márcia Regina Bedin. -- São Paulo, 2013.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.
Orientadora: Suemi Marui.

Descritores: 1.Doença de Graves/genética 2.Doença de Hashimoto/genética 3.Diabetes mellitus tipo 1 4.Polimorfismo genético 5.Pediatria 6. Doenças autoimunes/imunologia 7.Doenças da glândula tireoide/imunologia

USP/FM/DBD-193/13

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo, Guilherme, por seu amor, carinho, companheirismo e apoio incansável ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Aos meus pais, Maria e Aparecido, pela oportunidade da vida e pela valiosa oportunidade de ampliação de meus estudos e de meu conhecimento.

Aos meus irmãos, Neusa, Fátima e Marcos, pela convivência desde o início de minha vida.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Dra Suemi Marui, pelos ensinamentos, pela dedicação à pesquisa e pela paciência em meu processo de aprendizagem.

À Dra Éricka Trarbach, que me recebeu de braços abertos para a realização das técnicas de genotipagem.

À Dra Debora Seguro Danilovic e à Erika Urbano de Lima pelo compartilhamento do banco de dados do grupo controle deste trabalho.

Ao Prof Dr Durval Damiani, pelo incentivo e apoio inicial para o desenvolvimento deste projeto.

À Profª Dra Lea M. Z. Maciel, ao Prof Dr Gil Guerra-Junior, à Dra Márcia Queiroz, à Dra Thaís Della Manna, Dra Maria Elizabeth Rossi da Silva, pela oportunidade de compartilhar as informações dos pacientes incluídos neste trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Profª Dra Maria Lúcia Gianella, Dra Maria Elizabeth Rossi da Silva e Dra Débora Romeo Bertola pelas sugestões a esta tese.

Aos assistentes da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança, Dr Durval, Dr Hamilton, Dr Hilton, Dra Leandra, Dra Louise, Dra Nuvarte, Dra Thaís, Dr Vaê, pelos ensinamentos na endocrinologia.

À Valeria Samuel Lando, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM-42, pelo apoio para realização das dosagens hormonais.

À Maria Auxiliadora, LIM-25, pelo apoio para extração dos DNAs.

Às amigas: Ana Cristina Rolim de Freitas, Roberta Savoldelli, Roberta Castro, Cristiane B Barra e Juliana Martins Rodrigues pela amizade e apoio ao longo desses anos.

Aos residentes que conheci ao longo desses anos, que de alguma forma puderam ajudar na realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro fornecido para este trabalho.

Aos pacientes que fizeram parte deste trabalho.

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2009/17327-7.

RESUMO

Bedin MR. Associação dos polimorfismos -318C/T, CT60 e A49G do gene *CTLA4*, R620W do gene *PTPN22* e A946T do gene *IFIH1* em pacientes pediátricos com doença autoimune tireoidiana e diabetes mellitus tipo 1 [Dissertação]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

As doenças autoimunes da tireoide (DAIT) representadas, principalmente pela doença de Graves (DG) e tireoidite de Hashimoto (TH), apresentam causas multifatoriais, incluindo fatores genéticos e ambientais. Diversos genes estão envolvidos, entre eles *CTLA4*, *PTPN22* e mais recentemente *IFIH1,* principalmente quando associados a diabetes mellitus tipo 1 (DM1). **OBJETIVOS:** Determinar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos: -318C/T, A49G e CT60 do *CTLA4*, R620W do *PTPN22* e A946T do *IFIH1* em pacientes pediátricos portadores de DG, TH e DM1 associado a TH e em uma população controle normal, e determinar a associação com características clínicas e laboratoriais. **MATERIAL E MÉTODOS**: Foram estudados 142 pacientes menores de 21 anos ao diagnóstico. Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos em prontuário. A genotipagem foi realizada por PCR em tempo real de todos os polimorfismos. Dados clínicos e laboratoriais como sexo, idade de início, bócio, anticorpos anti-GAD, IA2 e IAA e níveis de TRAb e anti-TPO foram analisados. **RESULTADOS:** Sessenta e dois pacientes foram diagnosticados com DG, com idade média ao diagnóstico (IMD) de 10,8 ± 4,4 anos, sendo 43 do sexo feminino; TH esteve presente em 44 pacientes, sendo 37 meninas, com IMD de 10,3 (± 2,9 anos); e 36 pacientes com DM1 associado a TH, sendo 21 meninas, com IMD de 6,2 (± 4,0 anos) no momento do diagnóstico de DM1 e de 11,6 (± 4,6 anos) ao diagnóstico de TH. O grupo controle foi constituído por 81 indivíduos sem diabetes, função tireoidiana normal e ausência de anticorpos antitireoidianos. Todos os polimorfismos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O polimorfismo -318C/T não esteve associado com nenhum dos grupos. O alelo de risco G do polimorfismo A49G foi mais frequente em pacientes com TH (p=0,047) e o genótipo patogênico (AG e GG) foi mais frequente em pacientes com DG (p=0,049). O alelo de risco G do polimorfismo CT60 foi mais frequente apenas em pacientes com DG (p=0,035). O alelo de risco T do polimorfismo R620W foi mais frequente em pacientes com DM1 associado a TH (p=0,043). O alelo de risco T do polimorfismo A946T foi mais frequente em pacientes com DM1 associado a TH (p=0,009), assim como o genótipo patogênico (CT e TT) quando comparado ao grupo controle (p=0,007). Quando agrupamos todas as DAIT, observamos associação com A49G (p=0,024) e R620W (p=0,047). Quando agrupamos apenas pacientes com TH, encontramos diferença no A49G (p=0,018) e no A946T (p=0,041). O polimorfismo CT60 foi associado com menor duração da terapia medicamentosa no grupo DG (p=0,004), mas não com os níveis de TRAb ou presença de bócio. No DM1 com HT, o alelo de risco do A49G foi mais frequentemente encontrado no sexo masculino (p=0,04); R620W foi relacionado com a presença de bócio (p=0,03), enquanto A946T foi associado com níveis de anti-TPO mais baixos (p=0,047). Os níveis de anti-GAD, IA2 e

IAA não foram associados aos polimorfismos. **CONCLUSÃO:** Encontramos associações genéticas diferentes entre os pacientes com DAIT, sugerindo que as crianças possuem provavelmente padrões genéticos distintos, apesar do menor tempo de exposição a fatores ambientais.

Descritores: 1.Doença de Graves/genética 2.Doença de Hashimoto/genética 3.Diabetes mellitus tipo 1 4.Polimorfismo genético 5.Pediatria 6.Doenças autoimunes/imunologia 7.Doenças da glândula tireoide/imunologia

SUMMARY

Bedin MR. Association of -318C/T, A49G and CT60 polymorphisms of *CTLA4* gene, R620W of *PTPN22* gene, and A946T of *IFIH1* gene in pediatric patients with autoimmune thyroid disease and type 1 diabetes mellitus [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Autoimmune thyroid diseases (AITD) represented by Graves' disease (GD) and Hashimoto's thyroiditis (HT), have multifactorial causes, including genetic and environmental factors. Several genes are involved, including *CTLA4*, *PTPN22* and more recently *IFIH1*, especially when associated with type 1 diabetes (T1D). **OBJECTIVES:** To determine the allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms: -318C/T, A49G and CT60 of *CTLA4*, R620W of *PTPN22* and A946T of *IFIH1* in pediatric patients with GD, HT and T1D associated with HT and in a control population and determine association with clinical and laboratory features. **MATERIAL AND METHODS:** We studied 142 patients under 21 years at diagnosis. Clinical and laboratory data were obtained from medical records. Genotyping was performed by real time PCR for all polymorphisms. Clinical and laboratory data were analyzed, such as gender, age of onset, goiter, anti-GAD, IA2 and IAA levels and TRAb and anti-TPO levels. **RESULTS:** Sixty-two patients were diagnosed with GD, with mean age at diagnosis (MAD) of 10.8 ± 4.4 years, 43 females; HT was present in 44 patients, 37 girls, MAD 10.3 (± 2.9 years) and type 1 diabetes associated with HT was present in 36 patients, 21 girls, MAD 6.2 (± 4.0 years) at diagnosis of T1D and 11.6 (± 4.6 years) at diagnosis of HT. Control group consisted of 81 subjects without diabetes, normal thyroid function and absence of antithyroid antibodies. All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. The polymorphism -318C/T was not associated with any of the groups. The risk allele G of A49G polymorphism was more frequent in patients with HT (p=0.047) and the pathogenic genotype (AG and GG) was more frequent in patients with GD (p=0.049). The risk allele G of CT60 polymorphism was more frequent only in patients with GD (p=0.035). The risk allele T of R620W polymorphism was more frequent in patients with T1D associated with HT (p=0.043). The risk allele T of A946T polymorphism was more frequent in patients with T1D associated with HT (p=0.009), as well as the pathogenic genotype (CT and TT) compared to control group (p=0.007). When all AITD is grouped, we observed association with A49G (p=0.024) and R620W (p=0.047). Only when patients with HT are grouped, we found differences in A49G (p=0.018) and A946T (p=0.041). CT60 polymorphism was associated with a shorter duration of drug therapy on GD group (p=0.004), but no association with TRAb levels or presence of goiter were found. In T1D with HT, the risk allele of A49G was more often found in males (p=0.04); R620W was associated with presence of goiter (p=0.03), while A946T was associated with anti-TPO levels (p=0.047). The anti-GAD, IAA and IA2 levels were not associated with any polymorphisms. **CONCLUSION:** We found different genetic associations among patients with AITD, suggesting that children are likely to have distinct genetic background, despite shorter exposure to environmental factors.

Descriptors: 1.Graves disease/genetics 2.Hashimoto disease/genetics 3.Type 1 diabetes mellitus 4.Polymorphism, genetic 5.Pediatry 6.Autoimmune diseases/immunolgy 7.Thyroid diseases/immunology

ABREVIATURAS

-318C/T	substituição de citosina por timina na posição 318 da região promotora do gene CTLA4
A49G	substituição de adenina por guanina na posição 49 do éxon1 do gene CTLA4
A946T	mudança de alanina por treonina no códon 946
AIRE	regulador da autoimunidade, do inglês “autoimmune regulator”
anti-GAD65	anticorpo antienzima descarboxilase do ácido glutâmico 65
anti-IA2	anticorpo antiproteína de membrana com homologia às tirosino fosfatases ou antiantígeno 2 do insulinoma
anti-TPO	anticorpo antitireoperoxidase
anti-Tg	anticorpo antitireoglobulina
APCs	células apresentadoras de antígenos, do inglês “antigen presenting cell”
APECED	do ingles, “Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy”
C1858T	substituição de citosina por timina na posição 1858 do gene PTPN22
CT60	substituição de guanina por adenina na posição +6230 na extremidade 3’ do gene CTLA4
CTLA4	antígeno-4 associado ao linfócito-T citotóxico, do inglês “cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4”
DCs	células dendríticas, do inglês “dendritic cells”
DM1	Diabetes mellitus tipo 1

DAIs	doenças autoimunes
DAI	doença autoimune
DAIT	doenças autoimunes da tireoide
DAT	drogas antitireoidianas
DG	doença de Graves
dsRNA	do inglês “Double-strended RNA”
FADD	do inglês “Fas-associated death domain containing protein”
HLA	antígeno leucocitário humano, do inglês “human leukocyte antigen”
IC 95%	intervalo de confiança de 95%
IAA	anticorpos anti-insulina
ICA	anticorpo anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático
IFN-γ	interferon gama
IKK-i	do inglês “Inducible IkB kinase”
IL-1	interleucina 1
IFIH1	do inglês “interferon-induced helicase”
IPEX	síndrome de desregulação imunológica, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X, do inglês “imune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked”
IPS-1	do inglês “IFN-β promoter stimulator-1”
LGP2	do inglês “laboratory of genetics and physiology 2”
LB	linfócitos B
LT	linfócitos T

LT-CD4+	linfócito T auxiliar
LT-CD8+	linfócito T citotóxico
LYP	do inglês “lymphoid tyrosine phosphatase”
MHC	complexo principal de histocompatibilidade, do inglês “Major histocompatibility complex”
NAP1	do inglês “nucleossome assembly-associated protein 1”
NIS	transportador deiodeto de sódio
NOD	diabético não obeso, do inglês “non-obese diabetic”
OR	razão de chances, do inglês “odds ratio”
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PKR	do inglês “Protein Kinase R”
PTPN22	do inglês “Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22”
R620W	troca de uma arginina por um triptofano no códon 620
RIG-I	do inglês “retinoic acid-inducible gene 1”
SINTBAD	do inglês “similar to NAP1 TBK1 adaptor”
SPA1	síndrome poliglandular autoimune tipo 1
SPA2	síndrome poliglandular autoimune tipo 2
SPA3	síndrome poliglandular autoimune tipo 3
TBK1	do inglês “TANK-binding kinase 1”
TCR	receptor da célula T, do inglês “T-Cell Receptor”
TH	tireoidite de Hashimoto
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa, do inglês “tumor necrosis factor”
TSHR	Receptor de TSH, do ingês “thyroid-stimulating hormone receptor”

TLRs	do inglês “Toll-like receptors”
TRAb	anticorpos contra o Receptor de TSH
TSH	hormônio estimulador de tireoide, do inglês “Thyroid stimulating hormone”

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência dos autoanticorpos em pacientes com DM1..... 9

Tabela 2 - Identificação dos polimorfismos, incluindo seus respectivos ensaios de genotipagemTaqMan® , dos genes CTLA4, PTPN22 e IFIH1 estudados nos pacientes com DG, TH e DM1..... 31

Tabela 3 - Correlação com o sinal de fluorescência na técnica de genotipagem TaqMan® utilizada. 31

Tabela 4 - Condições da reação de genotipagem por PCR em tempo real. 32

Tabela 5 - Dados clínicos dos grupos estudados. 38

Tabela 6 - Frequências do polimorfismo -318C/T do CTLA4 nos grupos estudados de acordo com os alelos e genótipos. 42

Tabela 7 - Frequências do polimorfismo A49G do CTLA4 nos grupos estudados de acordo com alelos e genótipos. 43

Tabela 8 - Frequências do polimorfismo CT60 do CTLA4 nos grupos estudados de acordo com alelos e genótipos. 44

Tabela 9 - Frequências do polimorfismo R620W do PTPN22 nos grupos estudados de acordo com alelos e genótipos. 46

Tabela 10 - Frequências do polimorfismo A946T do IFIH1 nos grupos estudados de acordo com alelos e genótipos. 48

Tabela 11 - Análise estatística (valores de p) comparando as frequências dos alelos e genótipos entre os grupos estudados. 50

Tabela 12 - Valores estatísticos de p para os genótipos e alelos dos polimorfismos 318C/T, A49G e CT60 do CTLA4 em comparação ao grupo controle..... 52

Tabela 13 - Valores estatísticos de p para os genótipos e alelos dos polimorfismos R620W do PTPN22 e A946T do IFIH1 em comparação ao grupo controle..... 52

Tabela 14 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com o sexo dos pacientes com doença de Graves. 53

Tabela 15 - Associação dos polimorfismos estudados de acordo com a idade ao diagnóstico da doença de Graves. 54

Tabela 16 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a presença de exoftalmopatia nos pacientes com doença de Graves. 54

Tabela 17 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a presença de bócio nos pacientes com doença de Graves. 55

Tabela 18 - Associação dos polimorfismos estudados de acordo com os valores de TRab em 35 pacientes com doença de Graves. 55

Tabela 19 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a realização de radioiodoterapia. 56

Tabela 20 - Associação dos polimorfismos estudados com os dados clínicos e laboratoriais nos pacientes com doença de Graves. 58

Tabela 21 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com o sexo dos pacientes com TH. 59

Tabela 22 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a idade do diagnóstico de tireoidite de Hashimoto. 59

Tabela 23 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a presença de bócio nos pacientes com tireoidite de Hashimoto. 60

Tabela 24 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com os valores de anti-TPO nos pacientes com tireoidite de Hashimoto. 60

Tabela 25 - Associação dos polimorfismos estudados com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com tireoidite de Hashimoto. 61

Tabela 26 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com o sexo dos pacientes com DM1+TH. 62

Tabela 27 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a idade do diagnóstico de DM1 associado a tireoidite de Hashimoto. 64

Tabela 28 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a presença de bócio nos pacientes com DM1 associado a tireoidite de Hashimoto. 64

Tabela 29 - Associação dos polimorfismos estudados de acordo com os valores de anti-TPO dos pacientes com DM1 associado a tireoidite de Hashimoto. 65

Tabela 30 - Associação dos polimorfismos estudados de acordo com os valores de anti-GAD, IA2 e IAA dos pacientes com DM1 associado a tireoidite de Hashimoto. 66

Tabela 31 - Associação dos polimorfismos estudados e os dados clínicos e laboratoriais nos pacientes com DM1 associado à tireoidite de Hashimoto. 66

Tabela 32 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com o sexo dos pacientes com tireoidite de Hashimoto (grupos 2+3). 67

Tabela 33 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a idade do diagnóstico de tireoidite de Hashimoto agrupado (grupos 2+3). 69

Tabela 34 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a presença de bócio nos pacientes com tireoidite de Hashimoto (grupos 2 e 3). 69

Tabela 35 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com os valores de anti-TPO dos pacientes com diagnóstico de tireoidite de Hashimoto (grupos 2 e 3). 70

Tabela 36 - Associação dos polimorfismos estudados com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com tireoidite de Hashimoto agrupado (grupos 2 +3). 71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura gênica do MHC humano: genes HLA classe I (HLA-A, B e C), de classe II (HLA-DR, DQ e DP) e os da classe III [19]. 13

Figura 2 - Interação do complexo da molécula HLA de classe II com o peptídeo antigênico e o TLR [19]..... 14

Figura 3 - Interação entre APC e o LT, levando a ativação ou inibição da resposta imune [19]. 15

Figura 4 - Representação esquemática dos domínios codificados e a localização dos principais polimorfismos no gene *CTLA4* [44]. 16

Figura 5 - Representação do exon 14 do gene PTPN22, identificando a troca de C por T na posição 1858 do gene, levando a substituição do aminoácido arginina por triptofano (Modificado de Dultz G.)[59]. 19

Figura 6 - Mecanismo de interação entre PTPN22 e CsK , que leva a inibição da ativação da célula T pela remoção de um grupo fosfato ativado (Modificado de Gregersen PK.) [55]..... 19

Figura 7 - Modelo de como a variante W620 pode mudar a seleção tímica, permitindo que células T autorreativas sobrevivam e entrem na circulação. A seta marrom dentro do timócito mostra a intensidade do sinal do TCR (Modificado de Bottini N.) [60]..... 20

Figura 8 - Mecanismo de autoimunidade sugerido a partir da detecção do RNA viral (Modificado de Chistiakov D.A) [67]. 22

Figura 9 - Reconhecimento do RNA viral mediado por IFIH1 (MDA5) seguido de resposta inata (Modificado de Chistiakov D.A) [67]. 24

Figura 10 - (A) Organização genômica do cromossomo 2q 24.3: genes IFIH1, glucagon (GCG), proteína de ativação do fibroblasto (FAP-a), grancalcin (GCA) e do canal de potássio e da subfamília H (KCNH7); (B) e (C) Estrutura do gene IFIH1 e localização do polimorfismo (Modificado de Chistiakov D.A) [67]. 24

Figura 11 - Representação do processo de infecção viral e a resposta de interferon no DM1. Na infecção viral, o *IFIH1* é ativado nas células pancreáticas produtoras de insulina, aumentando os níveis de interferon. Ocorre então a inibição da replicação viral, mas também aumenta a expressão de moléculas MHC-I. As células T reconhecem as moléculas MHC-I na superfície, danificando a célula pancreática até a destruição, resultando em DM1 (Modificado de Von Herrath M.) [69]..... 25

Figura 12 - Exemplo de gráfico de discriminação alélica através do sistema TaqMan®. Alelo 2: homozigoto, Alelos 1/2: heterozigoto, Alelo 1: homozigoto..... 32

Figura 13 - Curva da amplificação de amostras submetidas a genotipagem através do sistema TaqMan®. (A) Homozigoto para o alelo 1, (B) Heterozigoto (1/2), (C) Homozigoto para o alelo 2, (D) Controle negativo da reação..... 33

Figura 14 - Distribuição da idade do diagnóstico dos pacientes com doença de Graves, tireoidite de Hashimoto e DM1 associado a tireoidite de Hashimoto (teste de Mann-Whitney). 39

Figura 15 - Distribuição dos valores de anti-TPO nos grupos 2 (tireoidite de Hashimoto) e 3 (DM1 associado a tireoidite de Hashimoto). A linha tracejada representa a mediana encontrada..... 40

Figura 16 - Frequência dos alelos patogênico (G) e não patogênico (A) do polimorfismo A49G do CTLA4 nos grupos doença autoimune da tireoide (DAIT), doença de Graves (DG), tireoidite de Hashimoto (TH), DM1 associado a TH (DM1+TH) e tireoidite agrupado (TH agrupado) e grupo controle (teste qui-quadrado). 43

Figura 17 - Frequências dos genótipos patogênicos (AG e GG) e não patogênico (AA) do polimorfismo A49G do CTLA4 nos grupos doença autoimune da tireoide (DAIT) e doença de Graves (DG) e grupo controle (teste qui-quadrado). 44

Figura 18 - Frequência dos alelos patogênico (G) e não patogênico (A) do polimorfismo CT60 do CTLA4 no grupo doença de Graves (DG) e grupo controle (p=0,035, teste qui-quadrado). 45

Figura 19 - Frequências de alelos patogênico (T) e não patogênico (C) do polimorfismo R620W do PTPN22 nos grupos doença autoimune da tireoide (DAIT), DM1 associado a TH (DM1+TH) e grupo controle (teste exato de Fisher). 47

Figura 20 - Frequências dos alelos patogênico (T) e não patogênico (C) do polimorfismo A946Tdo IFIH1 no grupo DM1 associado a TH (DM1+TH), tireoidite agrupado (TH agrupado) e grupo controle (teste qui-quadrado)..... 49

Figura 21 - Frequências dos genótipos patogênicos (CT e TT) e não patogênicos (CC) do polimorfismo A946Tdo IFIH1 nos grupos DM1 associado a TH (DM1+TH) e grupo controle (teste exato de Fisher). 49

Figura 22 - Frequências dos genótipos patogênicos (CT e TT) e não patogênicos (CC) do polimorfismo A946Tdo IFIH1 no grupo doença de Graves

(DG) comparado ao grupo com DM1 associado a TH (DM1+TH) (teste exato de Fisher). 50

Figura 23 - Frequências dos genótipos patogênicos (CT e TT) e não patogênicos (CC) do polimorfismo A946Tdo IFIH1 no grupo tireoidite de Hashimoto comparado ao grupo DM1 associado a TH (DM1+TH) (teste exato de Fisher). 51

Figura 24 - Frequência dos alelos patogênico (G) e não patogênico (A) do polimorfismo A49G do CTLA4 nos pacientes com doença de Graves que receberam ou não radioiodoterapia (RIT)..... 56

Figura 25 - Frequência dos genótipos patogênicos (AG e GG) e não patogênico (AA) do polimorfismo A49G do CTLA4 nos pacientes com doença de Graves que receberam ou não radioiodoterapia (RIT)..... 57

Figura 26 - Associação do tempo de uso de DAT em pacientes do grupo 1 (DG) de acordo com o alelo não patogênico e patogênico do polimorfismo CT60 do gene CTLA4. 57

Figura 27 - Frequências de alelos patogênico (G) e não patogênico (A) do polimorfismo A49G do CTLA4 no grupo DM1 associado a tireoidite de Hashimoto (grupo 3) de acordo com o sexo (teste exato de Fisher). 63

Figura 28 - Frequências dos genótipos patogênicos (AG e GG) e não patogênico (AA) do polimorfismo A49G do CTLA4 no grupo DM1 associado a tireoidite de Hashimoto (grupo 3) de acordo com sexo (teste exato de Fisher). 63

Figura 29 - Distribuição dos valores de anti-TPO dos pacientes do grupo 3 (DM1 + tireoidite de Hashimoto) de acordo com o genótipo não patogênico e patogênico do polimorfismo IFIH1. 65

Figura 30 - Frequências dos alelos patogênico (T) e não patogênico(C) do polimorfismo R629W o PTPN22 no grupo tireoidite de Hashimoto agrupado de acordo com sexo (teste exato de Fisher). 68

Figura 31 - Frequências dos genótipos patogênicos (CT e TT) e não patogênico (CC) do polimorfismo R629W do PTPN22 no grupo de pacientes tireoidite de Hashimoto agrupado de acordo com sexo (teste exato de Fisher). 68

Figura 32 - Distribuição dos valores de anti-TPO dos pacientes com tireoidite de Hashimoto agrupado (grupos 2+3) de acordo com o genótipo não patogênico e patogênico do polimorfismo IFIH1. 70

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: QUESTIONÁRIO.....79
Anexo 2: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....81
Anexo 3: Aprovação do protocolo de pesquisa pela CAPPesq 84
Anexo 4: Aprovação da mudança de título do protocolo de pesquisa pela CAPPesq.....85

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 1

1. DOENÇAS AUTOIMUNES 1

2. DOENÇAS AUTOIMUNES DA TIREOIDE: DOENÇA DE GRAVES E TIREOIDITE DE HASHIMOTO 4

3. SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA PARA DAIT 11

3.1. SISTEMA HLA (*HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN*) 11

3.2. GENES DE SUSCEPITBILIDADE 14

3.2.1. CTLA4 14

3.2.2. PTPN22 18

3.2.3. IFIH1 21

OBJETIVOS 27

CASUÍSTICA E MÉTODOS 28

AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE GENOTIPAGEM 30

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DOS ALELOS E GENÓTIPOS 33

ANÁLISE ESTATÍSTICA 34

RESULTADOS 35

1. GRUPO 1: DOENÇA DE GRAVES 35

2. GRUPO 2: TIREOIDITE DE HASHIMOTO 36

3. GRUPO 3: DM1 E TH 36

4. GRUPO CONTROLE 37

EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM 41

FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS 42

1. POLIMORFISMOS DO GENE *CTLA4* 42

2. POLIMORFISMO R620W DO GENE *PTPN22* 46

3. POLIMORFISMO A946T DO GENE *IFIH1* 48

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS 53

1. DOENÇA DE GRAVES 53

2. TIREOIDITE DE HASHIMOTO 59

3. DM1 ASSOCIADO À TIREOIDITE DE HASHIMOTO 62

4. TIREOIDITE DE HASHIMOTO AGRUPADO 67

DISCUSSÃO 72

CONCLUSÕES 78

BIBLIOGRAFIA 86

INTRODUÇÃO

1. DOENÇAS AUTOIMUNES

Nas doenças autoimunes, órgão específicas e sistêmicas, observam-se perda da capacidade do sistema imunológico do indivíduo em distinguir o que é próprio (*self*) daquilo que não é próprio (*non-self*). Essa capacidade é denominada autotolerância. A perda da autotolerância pode ter causas intrínsecas ou extrínsecas. As causas intrínsecas estão sob o controle genético individual. Geralmente estão associadas a polimorfismos de moléculas de histocompatibilidade, sistema complemento e receptores *Toll-like* (TLRs), linfócitos com atividade regulatória e citocinas, além de fatores hormonais. As causas extrínsecas estão relacionadas a fatores ambientais, como infecções bacterianas e virais, exposição a agentes físicos e químicos como luz ultravioleta, pesticidas e drogas [1].

As doenças autoimunes (DAI) são multifatoriais, tendo os fatores genéticos grande participação. Além da segregação familiar, a taxa de concordância para DAI é maior em gêmeos monozigóticos do que em dizigóticos. Porém, mesmo em um indivíduo geneticamente susceptível, geralmente é necessário um "gatilho" para que a autorreatividade ocorra.

As associações entre infecções e aparecimento de DAI são frequentes. Infecções podem desencadear a perda da autotolerância por vários mecanismos. Entre eles podemos citar o dano tecidual e a necrose celular, que expõem epítopos presentes em autoantígenos ou ainda permitindo a ativação de células imunocompetentes direta ou indiretamente ao antígeno. A apoptose é de grande importância na manutenção da tolerância central e periférica e também no controle das populações linfocitárias geradas no curso de uma resposta imune. Células apoptóticas devem ser rapidamente removidas por fagócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs), impedindo a exposição persistente de autoantígenos.

A formação de complexos imunes circulantes compostos de antígenos próprios e de anticorpos específicos produz doenças autoimunes sistêmicas, como o lúpus eritematoso sistêmico. Em contraste, respostas com

autoanticorpos ou células T contra antígenos próprios com distribuição tecidual restrita levam às doenças órgão específicas, como o diabetes mellitus tipo 1 (DM1).

O início das DAIs costuma se associar a infecções ou ser precedido por elas. As lesões de autoimunidade não se devem ao próprio agente infeccioso, mas resultam de respostas imunológicas do hospedeiro, que podem ser desencadeadas ou desreguladas pelo microrganismo. Infecções de tecidos podem induzir respostas imunológicas locais que recrutam leucócitos para os tecidos e resultam na ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs) teciduais. Essas APCs expressam coestimuladores e secretam citocinas, que ativam a célula T, resultando na quebra da tolerância das células T. Dois tipos de mecanismos principais promovem o desenvolvimento das DAIs: os microorganismos infecciosos podem conter antígenos que reagem de maneira cruzada com antígenos próprios, resultando em reações contra estes; ou os microorganismos podem ativar receptores semelhantes aos TLRs, levando à produção de citocinas ativadoras dos linfócitos ou em células B e consequentemente, produção de autoanticorpos [2].

A imunidade inata representa uma resposta rápida e estereotipada a um número grande, mas limitado, de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, por células especializadas e moléculas solúveis presentes em todos os indivíduos. A imunidade inata não depende de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato. As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, DCs e células *Natural Killer*. Os principais mecanismos na imunidade inata são: a fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema complemento, bem como a síntese de proteínas de fase aguda, assim como citocinas e quimiocinas [3].

Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa ou adquirida depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e de moléculas solúveis por eles produzidas. As principais características da resposta adaptativa são: a especificidade e diversidade de reconhecimento, a memória, especialização de resposta e a tolerância a componentes do próprio organismo. Embora as principais células envolvidas na resposta imune

adquirida sejam os linfócitos, as APCs desempenham papel fundamental em sua ativação, apresentando antígenos associados ao *major histocompatibility complex* (MHC) para as células T [3].

2. DOENÇAS AUTOIMUNES DA TIREOIDE: DOENÇA DE GRAVES E TIREOIDITE DE HASHIMOTO

As doenças autoimunes da tireoide (DAIT) são um grupo de desordens órgão-específicas que estão entre as DAI humanas mais comuns, afetando cerca de 5% da população em geral. Nesse grupo, destacam-se a doença de Graves e a tireoidite de Hashimoto. As duas doenças têm características comuns com outras DAI, como a susceptibilidade genética com segregação familiar e a presença de intenso infiltrado linfomonocitário [4]. Outras DAIT incluem a tireoidite pós-parto e tireoidite induzida por drogas, como interferon e amiodarona.

2.1. DOENÇA DE GRAVES

A doença de Graves (DG) afeta aproximadamente 0,5% da população em geral e é a principal etiologia da tireotoxicose [5]. Em crianças e adolescentes, é também a causa mais comum de tireotoxicose, sendo responsável por 10 a 15% dos distúrbios da tireoide [6]. Sua prevalência varia entre 0,1/100.000 nas crianças e aumenta para até 3/100.000 na adolescência, com pico entre 11 e 15 anos, acometendo 4 a 5 vezes mais o sexo feminino. Na maioria dos pacientes com DG, linfócitos B (LB) e linfócitos T (LT) são dirigidos aos três antígenos da tireoide, tireoglobulina (Tg), tireoperoxidase (TPO) e receptor de TSH (TSHR), bem como contra uma variedade de antígenos menores, como o transportador de iodeto de sódio (NIS). O TSHR é o principal autoantígeno na DG e os autoanticorpos conhecidos como TRAb (*thyrotropin receptor antibody*) se ligam ao TSHR nas células foliculares, causando hiperplasia da glândula, estimulando sua função e tireotoxicose [7; 8]. Os demais antígenos da tireoide apenas refletem o processo autoimune na tireoide.

Algumas manifestações clínicas que ocorrem em adultos com DG são raras em crianças, como a oftalmopatia de Graves, o mixedema pré-tibial e a fibrilação atrial. Nas crianças, o bócio geralmente é pequeno e chama a atenção a piora no rendimento escolar e o sono pouco regenerador, que se associa à fadiga e letargia durante o dia. Em alguns casos pode haver perda de

peso, aceleração do crescimento linear e diminuição de massa óssea. A oftalmopatia de Graves, quando ocorre, normalmente é leve [9].

O diagnóstico laboratorial da DG é confirmado pelo achado de concentrações séricas elevadas de T3 e T4 e concentrações diminuídas de TSH. A cintilografia com iodo radioativo mostra uma glândula difusamente aumentada de tamanho, hipercaptante com distribuição uniforme do radiofármaco. A medida de TRAb é elevada em 90% das crianças com DG. Os anticorpos antitireoperoxidase (anti-TPO) e antitireoglobulina (anti-Tg) também podem estar presentes em até 80% das crianças, porém, não são específicos para avaliação da DG [10].

2.2. TIREOIDITE DE HASHIMOTO

A tireoidite de Hashimoto (TH) é a DAIT que mais ocorre em crianças e adolescentes. Sua incidência aumenta nas fases iniciais da adolescência, ocorrendo 4 a 8 vezes mais frequentemente no sexo feminino. Raramente se manifesta antes dos 4 anos de idade. Como na DG, há a quebra da autotolerância do sistema imunológico, onde estão também incluídas causas genéticas e ambientais. As APCs expandem o processo imune levando o autoantígeno aos linfócitos na glândula tireoide; estes linfócitos, sensibilizados por diferentes antígenos tireoidianos, acumulam-se em grande quantidade e infiltram o parênquima da glândula. A destruição ou manutenção da integridade dos folículos determina a expressão fenotípica da doença. Quando ocorre a destruição da glândula, há apoptose celular, produzindo o hipotireoidismo [11].

Se o processo autoimune é leve, a tireoide é de tamanho normal e contêm infiltrados dispersos de linfócitos. Os folículos da tireoide envolvidos por esse infiltrado aparecem atróficos, perdendo parte ou a totalidade de seu colóide. Um pequeno número de células plasmáticas é misturado com linfócitos. Quando os focos de envolvimento são maiores e mais numerosos, as células foliculares sofrem metaplasia para células oxifílicas e pode haver formação de pseudonódulos pelo infiltrado linfocítico e fibrose. Nos casos mais avançadosde tireoidite autoimune, pouco ou nenhum parênquima normal é visível. O exame microscópico mostra que muitos folículos são pequenos, a

quantidade de colóide é diminuída e os infiltrados de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos são extensos. As células T são mais freqüentes entre as células epiteliais e no tecido intersticial longe defolículos linfóides. Podem ser observadas células gigantes inflamatórias espalhadas pelos folículos danificados. A quantidade de tecido conjuntivo na glândula aumenta frequentemente. Algumas células foliculares aparecem atróficas ou danificadas, muitas são hiperplásicas ou metaplásicas (células oncocítico ou Hürthle; metaplasia escamosa). A glândula geralmente é pequena e o hipotireoidismo está frequentemente presente [12].

A principal característica clínica, nas crianças com TH, é o aumento do volume cervical. Entretanto, a tireoidite atrófica também pode estar presente. As crianças com TH podem apresentar baixa estatura ou velocidade de crescimento progressivamente diminuída, com aumento do peso em relação a altura causados pelo hipotireoidismo. Pode ocorrer atraso no desenvolvimento puberal ou mesmo puberdade precoce, nos casos de hipotireoidismo grave [13].

O diagnóstico laboratorial da TH baseia-se na dosagem de anti-TPO e/ou anti-Tg positivos; T4 livre e total podem estar normais em fases iniciais da doença. Na evolução para o hipotireoidismo, há o aumento de TSH e diminuição dos hormônios tireoidianos. Na ultrassonografia, a glândula pode apresentar um parênquima heterogêneo e hipoecogênico [11; 13].

2.3. DAIT ASSOCIADA A OUTRAS DOENÇAS AUTOIMUNES

DAIT é componente das síndromes poliglandular autoimune. A síndrome poliglandular autoimune tipo 1 (SPA1) ou APECED (Autoimmune Poly Endocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy) apresenta herança autossômica recessiva e é causada por mutações no gene regulador de autoimunidade (AIRE). É caracterizada por hipoparatireoidismo, doença de Addison e candidíase mucocutânea crônica, que começam na infância ou início da adolescência. Outras desordens autoimunes como DM1, anemia perniciosa e hipogonadismo ocorrem em 15% a 30% dos pacientes. O hipotireoidismo autoimune é relativamente raro e afeta cerca de 5% dos pacientes. O desenvolvimento da DG é extremamente raro [12].

A síndrome poliglandular autoimune tipo 2 (SPA2) é caracterizada pela presença de doença de Addison associada à DAIT (TH ou DG) e/ou DM1. Outras DAIs também podem fazer parte da SPA2, entre elas alopécia, vitiligo, hepatite crônica, hipogonadismo hipergonadotrófico e hipofisite. A síndrome poliglandular autoimune tipo 3 (SPA3) muitas vezes é considerada uma variação da tipo 2 e é caracterizada pela presença de DAIT (TH ou DG) associada a pelo menos umas das seguintes: DM1, gastrite atrófica, vitiligo, alopécia, miastenia grave ou outras desordens autoimunes órgão-específicas. Definições adicionais de síndromes poliglandulares têm sido sugeridas pois elas englobamum amplo espectro clínico de doenças com uma apresentação altamente variável desde as primeiras manifestações[14].

Um estudo na Holanda mostrou que as DAIT podem ter expressões clínicas diferentes. A doença autoimune acometendo as adrenais apresentava maior associação com TH (9%) do que com a DG (3,3%, p=0.001), assim como a agressão autoimune às células beta pacreáticas foi mais frequentemente associada em pacientes com TH (25,4%) do que em pacientes com DG (15,6%, p=0,001). Os pacientes com TH apresentaram maior frequência de doença autoimune adrenal e gástrica (5,3%) do que os pacientes com DG (1,2%, p=0,001). Esses achados indicam que a TH e a DG diferem na expressão clínica e potencialmente na expressão autoimune, levando a não considerarmos a DAIT como uma única entidade clínica [15].

Outro distúrbio ainda mais raro é a síndrome de desregulação imunológica ou poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao X (IPEX). Esta é uma doença devastadora em lactentes do sexo masculino com deficiência de crescimento devido à enteropatia autoimune. Cerca de 50% e 90% dos homens afetados desenvolvem hipotireoidismo autoimune e DM1 no primeiro ano de vida respectivamente. IPEX é causada por mutações no gene *FOXP3*, localizado no cromossomo Xp11. FOXP3 é expresso em LT e é fundamental para o desenvolvimento de células T reguladoras, sem as quais não é possível ocorrer ativação e proliferação de LT-CD4+ (linfócito T auxiliar) [16].

2.4. DAIT ASSOCIADA A DIABETES MELLITUS TIPO 1

Quinze à 30% dos portadores de DM1 apresentam DAIT [17]. Mantovani et al., em Minas Gerais, avaliaram 383 pacientes com DM1, com idade entre 0,9 e 25 anos e duração média do diabetes de 9,3 ± 5,8 anos. Os anticorpos antitireoidianos foram detectados em 16,7% desses pacientes, particularmente no sexo feminino. A prevalência de TH aumentou com a idade e estava diretamente relacionada com a presença de outras DAI como doença celíaca, lúpus e vitiligo [18].

O DM1 tem início quando ocorre um desequilíbrio nos mecanismos de tolerância aos antígenos próprios resultando em insulite, com infiltrado inflamatório composto de LT e LB, macrófagos e DC. Os LT-CD4+ ativados agem no processo da insulite determinando reações inflamatórias e secreção de citocinas, como interleucina 1 (IL-1), interferon γ (IFN-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), culminando com a morte das células-beta pancreáticas. Os LT-CD4+ também funcionam como células auxiliares ativadoras dos LT-CD8+ e LB produtores de autoanticorpos.

O período de autoimunidade ativa, ou período pré-diabético assintomático, ou fase subclínica, precede o DM1 e pode ter duração de vários anos, sendo evidenciado pela presença de autoanticorpos contra antígenos das células-beta e pela perda progressiva da capacidade secretora de insulina. Na manifestação clínica de DM1, restam apenas 10% das células-beta. As demais células das ilhotas pancreáticas não são atingidas e persistem produzindo glucagon (células-alfa) e somatostatina (células-delta). O antígeno específico da célula-beta, que é alvo inicial do sistema imune, não está definido, mas os autoanticorpos contra vários componentes das células-beta, presentes no soro de pacientes diabéticos com diagnóstico recente e de indivíduos que posteriormente desenvolvem a doença, são importantes marcadores da sua progressão. A produção de anticorpos pelos LB parece não ser apenas secundária à destruição das células-beta e ao estímulo pelos LT. As células-beta também agem como apresentadoras de antígeno, necessárias à expansão eficiente dos LT-CD4+ autorreativos. Assim, no DM1, além da

tolerância pelos LT, há também a perda da tolerância pelos LB, que expressam imunoglobulinas autorreativas.

Os marcadores humorais mais frequentes da agressão imune são os anticorpos anti-insulina (IAA), anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático (ICA), anti-enzima descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GADT65) e antiproteína de membrana com homologia às tirosinofosfatases ou antiantígeno 2 do insulinoma (anti-IA2) (Tabela 1). Os autoanticorpos são raros na população controle não diabética (2% a 5%) [19].

Tabela 1 - Frequência dos autoanticorpos em pacientes com DM1

Autoanticorpos	Idade		
	0-9 anos	10-19 anos	20-39 anos
IAA	78%	43%	29%
ICA	86%	84%	60%
Anti-GAD 65	64%	80%	78%
IAA ou ICA	91%	92%	65%
IAA ou ICA ou Anti-GAD	91%	98%	85%
	Idade		
	<15 anos	20-40 anos	>40 anos
Anti-IA2	86%	45%	< 30%

IAA: anticorpo anti-insulina; ICA: anticorpo anti-ilhota de Langerhans; anti-GAD65: anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico 65; anti-IA2: anticorpo antitirosinafosfatase [19].

O IAA é um anticorpo tipo IgG1 de alta afinidade que reconhece epítopes da insulina e pró-insulina. O IAA tem predomínio em crianças, particularmente no sexo masculino, sendo menos frequente em adultos. Como pode ser também encontrado no soro de pacientes em uso de insulina não serve como marcador de autoimunidade, somente no início da terapêutica (após 7 a 10 dias).

Anti-GAD65 é frequentemente associado a outras doenças autoimunes e sua presença não necessariamente implica progressão rápida para DM1. Apresenta sensibilidade de 70% a 80% para o diagnóstico de diabetes

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

Crianças que desenvolvem DM1 até os 10 anos de idade apresentam os sinais de autoimunidade precocemente até os 2 anos de idade com rápida progressão para a presença de múltiplos autoanticorpos. Correspondem a 4% dos filhos de pais com DM1 e 6% das crianças com HLA (*human leukocyte antigen*) de alto risco. Aquelas que desenvolvem autoanticorpos mais tardiamente têm evolução mais lenta para a presença de múltiplos anticorpos e diabetes e menor frequência de IAA [19; 20].

2.5. DAIT ASSOCIADA À ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Alterações cromossômicas estão associadas com distúrbios da tireoide. Pacientes com síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21) têm uma alta prevalência de tireoidite de Hashimoto afetando de 15% a 20%. Entretanto, a DG ocorre com menor frequência, com uma prevalência de 1% a 2%. A síndrome de Turner, que é caracterizada pela perda total ou parcial do cromossomo X no sexo feminino também está associada com DAIT. Cerca de 15% dos pacientes com síndrome de Turner têm hipotireoidismo autoimune e 30% a 40% apresentam altas concentraçõesde anticorpos antitireoidianos.

A síndrome de Di George, causada pela deleção de um gene ou de um grupo de genes adjacentes ao cromossomo 22q11(del22q11), é caracterizada por malformação cardíaca, hipoplasia do timo, hipoparatireoidismo e anomalias faciais. A síndrome está associada com a DG em até 20% dos casos[12].

3. SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA PARA DAIT

A maioria das DAI é poligênica e os indivíduos afetados herdam múltiplos polimorfismos genéticos, sugerindo que os genes causadores influenciam os mecanismos de imunorregulação e autotolerância. Os *loci* de susceptibilidade podem conter dezenas de genes.

Assim como em outras DAI em que a suscetibilidade genética é fundamental, nas DAIT também se procura uma base genética. A susceptibilidade genética das DAIT é demonstrada em estudos com gêmeos. Um estudo com gêmeos dinamarqueses incluiu dados de gêmeos nascidos entre 1870 e 1920 e novos dados de gêmeos nascidos 1953 e 1976. Agrupando as 2 coortes havia oito pares de gêmeos monozigóticos e um par de gêmeo dizigóticos com DG. A taxa de concordância para DG foi de 0,35 (95% CI, 0,21-0,50) para os pares monozigóticose de apenas 0,03 (95% CI, 0,01-12) para o par dizigótico (p=0,02). A análise dos dados mostrou que 79% das causas para o desenvolvimento de DG nos gêmeos podem ser atribuíveis a fatores genéticos e fatores ambientais que não são não compartilhados pelos gêmeos e poderiam explicar os 21% restantes [21].

3.1. Sistema HLA (*human leukocyte antigen*)

Vários estudos demonstram a associação do HLA classe II com a DG. A frequência de DR3 em pacientes caucasianos com DG é de aproximadamente 40 a 50% e na população em geral, 15 a 30% (OR=4). A frequência de HLA DQA1*0501 também é maior em pacientes com DG (73,4% versus 42,7% em pacientes controles caucasianos; p=0,0001) [22; 23; 24].

Em DM1, tanto na doença humana quanto no modelo de camundongo NOD (diabético não obeso), foram identificados mais de 20 *loci* de susceptibilidade, principalmente os localizados na região do HLA lócus IDDM1. Estes genes contribuem em aproximadamente 50% para a susceptibilidade genética para o DM1 [25; 26; 27].

O MHC é composto pelos genes do complexo HLA e compreende mais de 120 genes localizados no cromossomo 6, dos quais mais de 20% estão associados à imunidade. A associação entre DAI e genes do MHC reflete o

importante papel dessas moléculas no direcionamento da resposta imune. Por seu papel na apresentação de antígenos, o MHC estabelece um elo entre a resposta inata e a resposta adaptativa.

O MHC compreende genes agrupados em classe I e classe II, separados pelos genes classe III (Figura 1). A região classe III é responsável por proteínas importantes na resposta imune. As moléculas de classes I e II estão envolvidas com a apresentação de peptídeos patogênicos aos LT e a resposta imune adaptativa. As moléculas de classe I, expressas na maioria das células somáticas, estão relacionadas ao processamento e à apresentação de antígenos intracelulares. São compostas por duas cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente, codificadas pelos genes A, B e C do cromossomo 6 (cadeia α) e o gene do cromossomo 15 (cadeia β2-microglobulina). Uma vez que esses genes apresentam codominância, cada indivíduo pode apresentar de três a seis diferentes tipos de moléculas de HLA de classe I na superfície de suas células, codificadas pelos alelos maternos e paternos dos genes HLA-A, B e C. As moléculas de classe I apresentam peptídeos endógenos para os LT-CD8+, isto é, peptídeos derivados de proteínas autólogas no citoplasma. Na região classe II também estão localizados genes que codificam diversas proteínas citosólicas associadas ao transporte e ao processamento de antígenos. As moléculas dessa região são expressas em um grupo de células do sistema imune, que incluem monócitos/macrófagos, DCs, epiteliais tímicas, LB e LT ativados, atuando no processamento e na apresentação de proteínas extracelulares. Estas são então degradadas quando capturadas pelas APCs e os peptídeos resultantes ligam-se às fendas de ligação peptídica das moléculas de classe II (Figura 2). Tais complexos serão reconhecidos como próprios ou não próprios pelos TCR (*toll like receptor*) antígeno específicos, determinando a resposta imunológica a ser desenvolvida.

As cadeias α e β das moléculas de classe II são codificadas pelos genes das famílias HLA-DR, DP e DQ, os genes de maior susceptibilidade ao diabetes mellitus. Diferentes alelos desses genes podem ser combinados, conferindo tanto um efeito de predisposição como de proteção à doença. Em geral, uma cadeia α de um tipo, por exemplo, DR, associa-se com a cadeia β do mesmo tipo, mas pode haver pareamento heterólogo, de modo que,

dependendo do grau de homozigose ou heterozigose, um indivíduo pode apresentar na superfície de suas APCs entre 10 e 20 diferentes moléculas de classe II. Na nomenclatura dos genes de classe II, a primeira letra indica a classe (D); a segunda, a família (M, O, P, Q, R); e a terceira, a cadeia A (α) ou B (β). Os genes individuais de cada uma dessas famílias são diferenciados por números, e a nomenclatura completa de uma variante alélica é precedida por um asterisco. Por exemplo, HLA-DRB1*0101 significa o alelo 0101 do gene 1, que codifica a cadeia β da molécula de classe II da família DR . As moléculas HLA de classe II apresentam para os LT peptídeos exógenos, isto é, derivados da proteólise de proteínas não autólogas nos fagolisossomos [3]. No caso do gene DR, os alelos DR3 e DR4 podem ser considerados de susceptibilidade ao DM1, sendo esta maior se os alelos forem observados em heterozigose (DR3/DR4) do que em homozigose (DR3/DR3 ou DR4/DR4); o alelo DR2 exerce um papel protetor. Da mesma forma funcionam os alelos do gene DQ e há uma tendência para as pessoas que herdam DR3 ou DR4 a herdar os alelos do gene DQ considerados de risco, aumentando a chance de desenvolvimento da doença. Os alelos protetores dos genes DR e DQ também tendem a ser herdados conjuntamente [23; 28; 29].

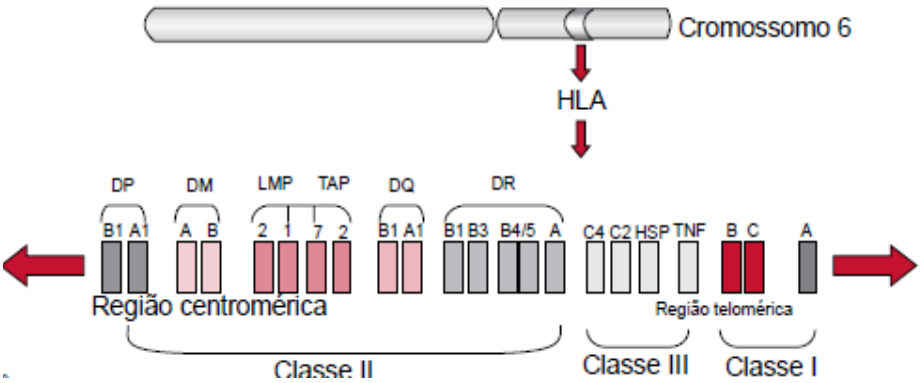

Figura 1 - Estrutura gênica do MHC humano: genes HLA classe I (HLA-A, B e C), de classe II (HLA-DR, DQ e DP) e os da classe III [19].

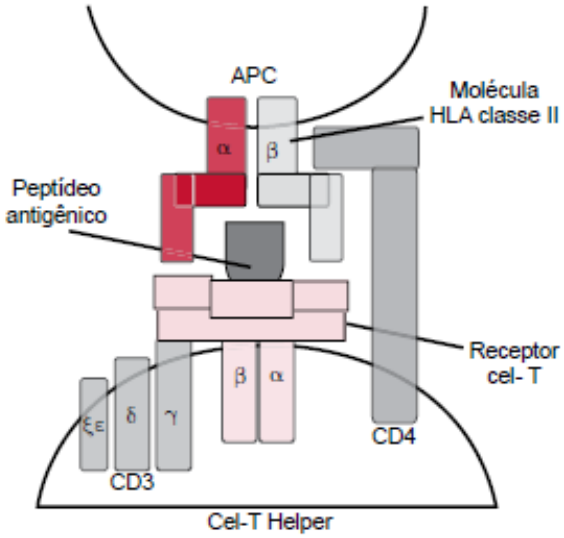

Figura 2 - Interação do complexo da molécula HLA de classe II com o peptídeo antigênico e o TLR [19].

Muitos outros genes são suspeitos de predispor a autoimunidade, principalmente quando ligados ao desenvolvimento do DM1, da TH e da DG; entre eles pode-se citar o gene *CTLA4* (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico), o *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) e o *IFIH1* (*interferon-induced helicase)*, também conhecido como *melanoma differentiation-associated* 5 – MDA-5 ou *Helicard gene*.

3.2. GENES DE SUSCEPITBILIDADE

3.2.1. CTLA4

O gene *CTLA4* é considerado um importante regulador da autoimunidade, localizado no cromossomo 2q33, é constituído por 4 éxons e 3 íntrons. O gene codifica uma proteína formada por 149 aminoácidos (aa), expressa exclusivamente na superfície de LT-CD4+ e LT-CD8+ ativados. Juntamente com CD28 (outra molécula coestimuladora expressa na superfície das células T ativadas), o *CTLA4* desempenha importante função na resposta dos LT aos antígenos [30].

A ativação do LT inicia-se quando o TCR antígeno específico se liga ao antígeno, que está acoplado a uma molécula do MHC classe II na superfície da

APC. Para continuar a ativação é necessário um segundo sinal estimulador, representado pela interação do CD28 com seus ligantes B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86). Dessa maneira, há a transmissão dos sinais de estímulo e produção de uma variedade de citocinas. A expressão dos ligantes B7.1 e B7.2 está aumentada na membrana dos LB ativados. Na ausência deste sinal, a ligação antígeno-receptor não é efetiva, causando apoptose da célula T. O *CTLA4* se liga às moléculas B7, porém, inibe o sinal de ativação celular. O *CTLA4* tem maior afinidade pelas moléculas B7 do que o CD28 (Figura 3) [31; 32].

A interação do *CTLA4* do LT com B7 da APC funciona como um regulador imune negativo bloqueando a ativação linfocitária através de dois possíveis mecanismos. Um dos mecanismos é a sinalização negativa em resposta a ativação do TCR, que ocorre nos estágios iniciais da resposta imune quando as expressões de *CTLA4* e B7 estão limitadas [33; 34]. O outro mecanismo é pela competição entre o CTLA4 e o CD28 pela ligação ao B7 que ocorre na superfície celular. A ligação de B7 ao CTLA4 leva ao término da resposta imune pela limitação da sinalização mediada pelo CD28, anergia e apoptose da célula T [35; 36]. O funcionamento defeituoso do *CTLA4* pode estar envolvido na autoimunidade como visto no camundongo deficiente de *CTLA4*, que apresenta uma doença letal autoimune linfoproliferativa extensa. Esse achado reforça a importância do *CTLA4* na manutenção da tolerância imune periférica e, consequentemente, na autoimunidade [37; 38].

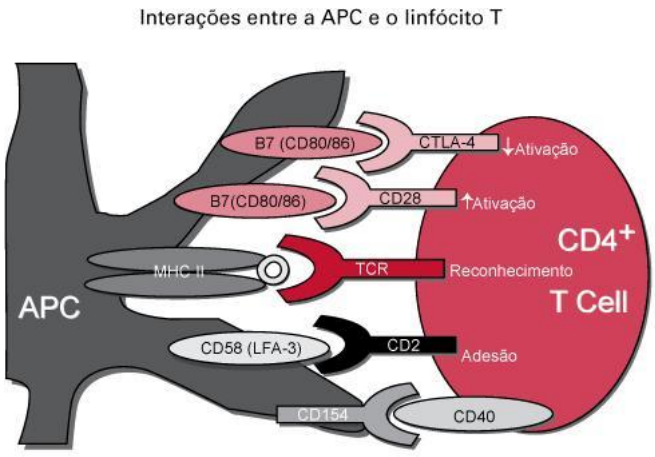

Figura 3 - Interação entre APC e o LT, levando a ativação ou inibição da resposta imune [19].

O significado dos polimorfismos no gene *CTLA4* ainda não está claro na DAIT. Diversos estudos têm demonstrado dados conflitantes em relação à associação desses polimorfismos com DG e TH. Vários polimorfismos têm sido estudados (Figura 4), dentre eles:

- Substituição de citosina por timina na posição -318 na região promotora (-318C/T; rs5742909). Essa alteração diminui a atividade promotora e a expressão do gene [39; 40];
- Substituição de guanina para adenina na posição 49 do exon 1 (A49G; rs231775), levando a troca do aminoácido alanina por treonina no códon 17. Essa troca acarretaria a diminuição da glicolisação e da expressão do *CTLA4* na superfície celular [41];
- Substituição de guanina por adenina na posição +6230 na extremidade 3´UTR (CT60; rs3087243). Essa troca diminuiria a expressão do RNA mensageiro do *CTLA4* [39; 41; 42; 43].

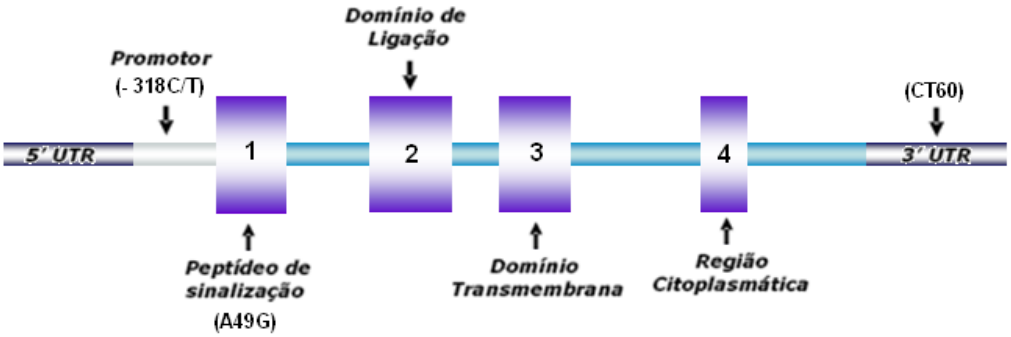

Figura 4 - Representação esquemática dos domínios codificados e a localização dos principais polimorfismos no gene *CTLA4* [44].

Em uma população proveniente da cidade de Campinas (SP), a presença do alelo T na região promotora -318 do *CTLA4* não foi associada a maior susceptibilidade a DG (p=0,12); quando foi estudado o mesmo polimorfismo na oftalmopatia de Graves foi observado que o genótipo CT era mais frequente entre pacientes com oftalmopatia do que naqueles sem esse acometimento (p=0,005) e que o gênero masculino (p=0,01), o tabagismo (p= 0,001) e o bócio (p=0,01) eram fatores de risco para o desenvolvimento da oftalmopatia de Graves; o genótipo CT foi considerado fator de risco para o

desenvolvimento de oftalmopatia principalmente para o sexo masculino (p=0,01; OR=7,59, IC=1,55-37,23) [45].

Um estudo na Turquia demonstrou que crianças com TH apresentavam maior frequência do genótipo CT região promotora -318 do *CTLA4* quando comparada ao grupo controle (16,4% versus 8,9% respectivamente), porém, não foi estatisticamente significante (p=0.32) [46].

Em uma população na Eslovênia, pacientes com DG, apresentaram a frequência do genótipo GG no polimorfismo A49G significativamente maior quando comparada aos controles, 13,8% e 5,1%, respectivamente [47]. A presença do alelo G no polimorfismo A49G esteve associada ao risco de recorrência da DG após o tratamento com drogas antitireoidianas (DAT) por um período que variou de 1 a 3 anos [44]. Um estudo brasileiro mostrou que o genótipo GG no polimorfismo A49G não contribuiu para o aparecimento da DG em 44 crianças e 72 adultos [48]. Já em crianças com TH, o mesmo estudo citado anteriormente, na Turquia, mostrou associação do genótipo A/G do polimorfismo A49G, sendo que o risco de apresentar TH foi 4,6 vezes maior quando comparado ao grupo com genótipo A/A [46].

A associação do polimorfismo A49G do *CTLA4* com DM1 foi exaustivamente estudada em populações de diferentes regiões. Demonstrou-se associação em estudos realizados na Espanha, Itália, França, China, Coréia, Marrocos, Bélgica, Japão e em populações americanas e mexicanas. A mesma não foi observada na Inglaterra, Alemanha e Checoslováquia. A associação com DM1 parece depender da distribuição do alelo na população estudada e da incidência da doença [19]. Em uma população iraniana, o polimorfismo A49G esteve associado com o desenvolvimento de DM1, principalmente em indivíduos mais jovens [49]. No Brasil, em um estudo da FMUSP, Gamberini et al. não observaram associação de dois polimorfismos do gene *CTLA4* (A49G e -318C/T) com DM1 [50]. Em estudo realizado com 279 pacientes e 151 controles normais por Hauache et al. também não observaram associação do polimorfismo A49G em 126 diabéticos [51].

Em um trabalho recente de meta-análise, observou-se associação significativa de DG e TH com a presença do alelo G no polimorfismo CT60 (OR

1,45 e 1,64 respectivamente) em diversas populações [52]. Em uma população da Eslovênia, o genótipo GG do polimorfismo CT60 foi significativamente maior nos pacientes com DG quando comparado aos controles (40,7% e 25,6%, respectivamente) [47]. Na população japonesa, a presença do alelo G do CT60 esteve associada à DG (84% e 72,6% em pacientes e controles). Por outro lado, quando estudado em pacientes com TH, o alelo G teve uma frequência tão alta quanto no grupo controle (76,3% e 72,6%, respectivamente), sugerindo fraca associação com a TH [42]. Entretanto, a frequência do genótipo GG foi significativamente mais alta em pacientes com diagnóstico de DM1 associado à TH quando comparado aos controles em uma população japonesa (65,5% e 55,2% respectivamente), sendo a associação ainda maior quando esses pacientes tinham anticorpo anti-ilhota positivo [53].

Dessa forma, a associação dos polimorfismos no gene *CTLA4* com a susceptibilidade às DAIT e DM1 permanece ainda duvidosa em diferentes populações, incluindo a brasileira.

3.2.2. PTPN22

O gene *PTPN22* está localizado no cromossomo 1p13 e codifica uma proteína tirosina fosfatase de 807 aa, expressa primariamente nos tecidos linfóides, chamada *lymphoid tyrosine phosphatase* (LYP). A LYP é uma proteína intracelular importante no controle negativo da ativação dos LT através da desfosforilação de proteínas envolvidas na sinalização em cascata do TCR.

A forma predominante da LYP nos humanos é uma proteína de 105 k-Da com um domínio catalítico N-terminal com alto grau de homologia com outras tirosinas fosfatases. Sabe-se que na porção C-terminal da proteína há uma sequência de quatro prolinas, denominada P1-P4, que se ligam ao domínio SH3 (*Src homology 3*) da tirosina quinase CsK, que suprime a família das SRC quinases fosforilando a porção C-terminal da proteína. A ativação do TCR leva à desfosforilação da tirosina-cinase LCK em Y505 pela fosfatase de membrana CD45, que seguida de autofosforilação LCK em Y394 é um evento precoce na ativação das células T (Figura 6). A ligação do PTPN22 com CsK remove o fosfato em Y394 e refosforila Y505, provocando a modulação negativa da sinalização do receptor de célula T [54].

A substituição de citosina por timina na posição 1858 (C1858T; rs2476601) no gene *PTPN22* resulta na substituição de uma arginina altamente conservada por um triptofano (R620W) no domínio de ligação com o SH3 da tirosina quinase Csk, envolvido na modulação negativa do receptor de célula T (Figuras 5 e 6) [55]. Estudos *in vitro* mostram que a variante W620 liga-se menos eficazmente ao Csk, sugerindo que o LT que expressa esse alelo pode apresentar uma resposta imune exacerbada [56]. O camundongo deficiente de *PTPN22* mostra desregulação seletiva no compartimento de células T efetoras e de memória, com aumento da proliferação celular e uma resposta precoce e exagerada das células T (Figura 7) [57].

Várias outras doenças autoimunes têm associação com este polimorfismo, dentre elas: Lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, artrite idiopática juvenil e vitiligo [58].

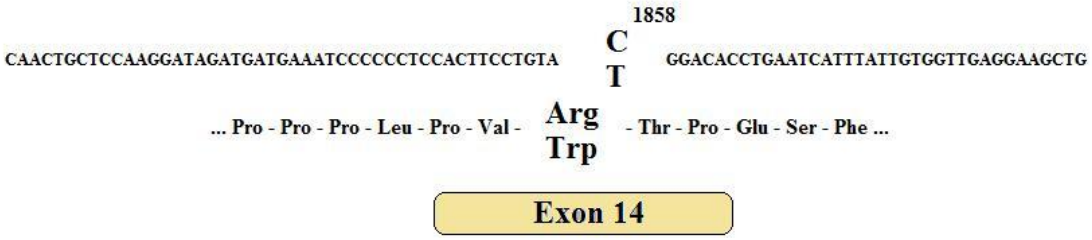

Figura 5 - Representação do exon 14 do gene PTPN22, identificando a troca de C por T na posição 1858 do gene, levando a substituição do aminoácido arginina por triptofano (Modificado de Dultz G.)[59].

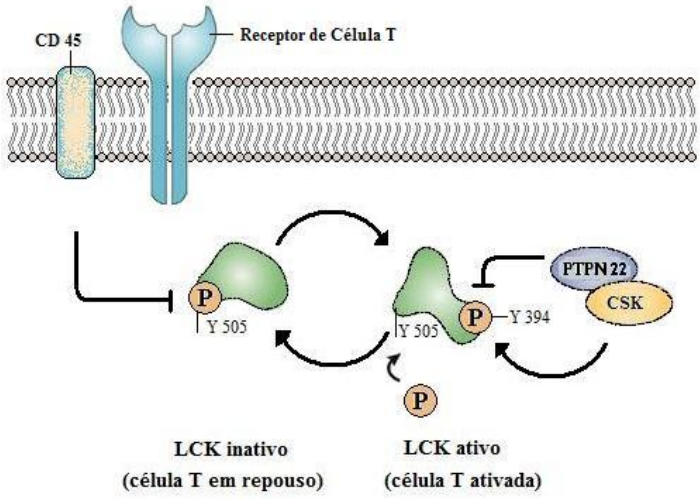

Figura 6 - Mecanismo de interação entre PTPN22 e CsK , que leva a inibição da ativação da célula T pela remoção de um grupo fosfato ativado (Modificado de Gregersen PK.) [55].

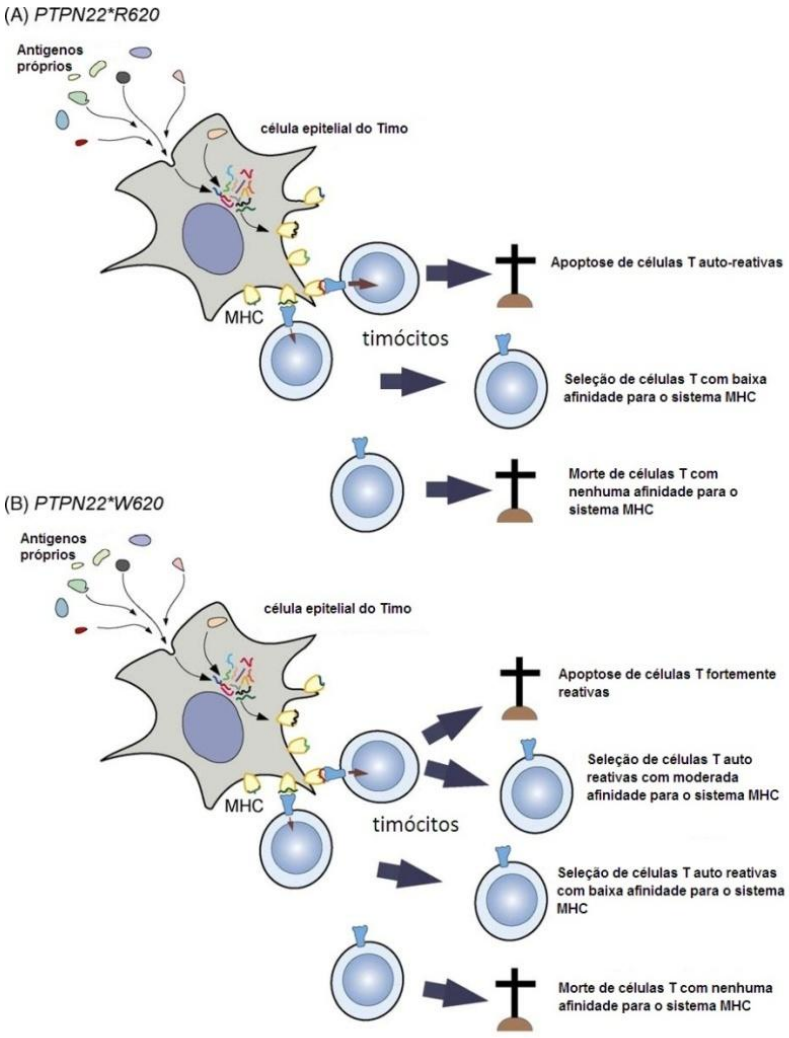

Figura 7 - Modelo de como a variante W620 pode mudar a seleção tímica, permitindo que células T autorreativas sobrevivam e entrem na circulação. A seta marrom dentro do timócito mostra a intensidade do sinal do TCR (Modificado de Bottini N.) [60].

Existem controvérsias sobre a associação do polimorfismo R620W do *PTPN22* com as DAIs, provavelmente devido às diferentes características genéticas de cada população estudada. Velaga et al. encontraram o alelo T patogênico em 13,8% de seus pacientes com DG e em 7,8% de seu grupo controle, sugerindo que a presença de W620 pode estar relacionada ao aparecimento da DG [61]. Em uma população da Polônia foi relatada a associação do alelo T com DG (pacientes 19,3% e controles 12,6%; OR 1,7 e p<0,0008) [62]. Em contraste, não houve diferença na frequência do alelo T entre pacientes com DAIT e controles em uma população Tunisiana (1% e 2.6%, respectivamente) [63] e também em uma população do Japão [64].

O polimorfismo R620W é originalmente descrito como fator de risco para DM1, independente do HLA [65]. Em um estudo realizado nesta Instituição (FMUSP) foi observado associação do alelo T com DM1 (17,9% versus 9,5% dos controles; OR 2,069). Já o genótipo C/C foi considerado protetor (OR 0,5) [66]. Em estudo alemão, a frequência do alelo T foi maior em pacientes com o diagnóstico de DM1 com DAIT (23,6%) quando comparada a pacientes com diagnóstico de DAIT isolada (8,6%) e controles (8%) [59]. Curiosamente, a associação do alelo T foi encontrada de forma mais expressiva na combinação DM1 e TH, do que na combinação DM1 e DG, uma vez que é reconhecida a associação do alelo T à DG quando não associado ao DM1.

Consequentemente, semelhante ao *CTLA4*, o *PTPN22* parecer ser mais um candidato em potencial para o desenvolvimento de DAIT. Polimorfismo neste gene não foi ainda estudado em população brasileira portadora de DG ou TH com início na infância ou adolescência.

3.2.3. IFIH1

As infecções virais como indutores da autoimunidade têm sido estudadas desde a década de 1980. Acredita-se que a autoimunidade ocorre principalmente de duas maneiras:

- Através de uma reação cruzada entre o antígeno viral e as células do hospedeiro que se tornam alvo do processo de autoimunidade;
- Através da ativação das células autorreativas devido aos efeitos inflamatórios induzidos pelo vírus que causam dano tecidual e liberação dos antígenos, alvo do sistema imunológico.

Os RNAs virais de cadeia dupla (dsRNA – *Double-stranded* RNA) representam um intermediário durante a replicação dos vírus em células infectadas. O primeiro passo para a detecção dos dsRNA depende da PKR (*Protein Kinase* R) que inibe a replicação viral em células infectadas. A segunda proteína estimulada pelo dsRNA é a 2'-5'-oligodenilato sintase, que promove a degradação do RNA viral e consequentemente a apoptose da célula infectada (Figura 8). Alguns sistemas de reconhecimento incluem mecanismos mediados pelos TLRs presentes na membrana plasmática e que detectam

patógenos extracelulares. A recente caracterização da família dos receptores DexD/H *box containing RNA helicase* tem definido um novo mecanismo antiviral independente dos TLR [67].

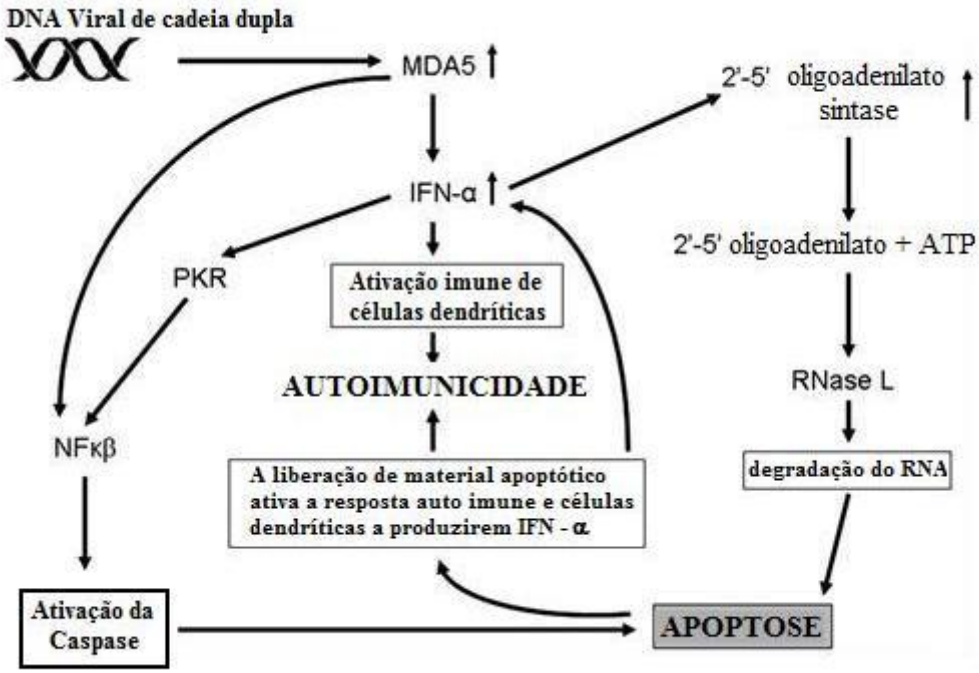

Figura 8 - Mecanismo de autoimunidade sugerido a partir da detecção do RNA viral (Modificado de Chistiakov D.A) [67].

Recentes estudos têm mostrado associação do *locus IFIH1*-GCA-KCNH7 com várias doenças autoimunes, entre elas DM1, esclerose múltipla, artrite reumatóide e DG. Essa região genômica contém o gene *IFIH1,* que codifica um receptor citoplasmático para RNA viral. A função deste receptor é detectar o RNA viral e desencadear apoptose dessas células infectadas. O *IFIH1* pertence à família dos DexD/H *box-containing RNA helicase*, que também inclui outros 2 membros, RIG-I e LGP2 (*laboratory of* g*enetics and* p*hysiology* 2). O *IFIH1* está localizado no cromossomo 2q24.3 e codifica uma proteína que possui dois domínios altamente conservados: o domínio N-terminal "recrutador" de caspase (CARD - *N-terminal caspase recruitment domain*) e o domínio C-terminal DexH/D RNA helicase relacionado ao RIG-I (*retinoic acid-inducible gene* 1). Juntamente com RIG-I e o CARD, o *IFIH1* (ou

MDA5) desencadeia a produção de interferon regulamentar fator-3 (IRF-3), IRF-7 e NFkβ (Figuras 9 a 11).O LGP2 é um regulador negativo que interfere no reconhecimento do RNA viral por *IFIH1* e RIG-1 [67].

IFIH-1 e RIG-I iniciam a cascata de sinalização pela interação do domínio N-terminal CARD com IPS-1 (IFN-β promoter stimulator-1). IPS-1 se liga aos membros da família TRAF (TRAF2, TRAF3 E TRAF6). Células com deficiência em TRAF3 têm deficiência na produção de alguns interferons e a resposta à infecção viral é comprometida. TRAF3 recruta duas proteínas quinases: TBK1 (TANK-*binding kinase* 1) e IKK-i (*Inducible IkB kinase*). As duas quinases formam um complexo com as TRAF associado ao ativador de NFkB (TANK), ao NAP1 (*nucleossome assembly-associated protein*1) e ao SINTBAD (*similar to NAP1 TBK1 adaptor*). Estes complexos fosforilam IRF-3 e IRF-7 que se translocam para o núcleo para induzir a expressão dos interferons. Adicionalmente, FADD (Fas-associated death domain containing protein) interage com caspase-8 e caspase-10 e IPS-1 e induz a produção de NFkB relacionada à produção de citocinas inflamatórias (Figura 9). A ativação inapropriada dessas proteínas poderia ter um efeito na autoimunidade [67]. Foi observado que camundongos deficientes em *IFIH1* são susceptíveis à infecção por picornavírus, sugerindo que *IFIH1* é importante para ativar a resposta contra a infecção viral. Esse fato é de interesse devido à evidência da importância da infecção viral no aparecimento do DM1 [68].

Cada helicase é individualmente responsável por desencadear a resposta imunológica para cada tipo de vírus. RIG-I é responsável por sinalizar a resposta para o paramixovírus, os vírus influenza A e B e vírus da hepatite C, enquanto o *IFIH1* é responsável por sinalizar a resposta para os picornavírus e paramixovírus (mais que o RIG-I).

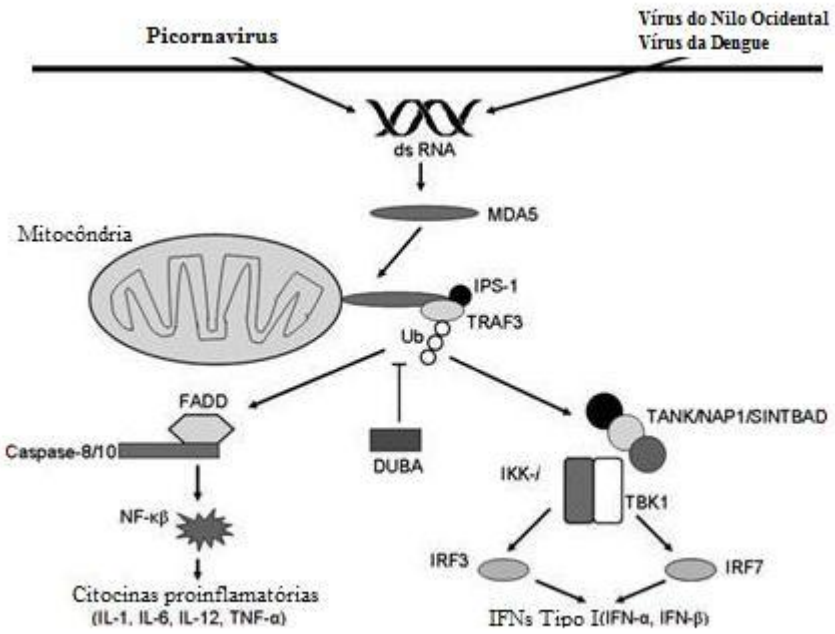

Figura 9 - Reconhecimento do RNA viral mediado por IFIH1 (MDA5) seguido de resposta inata (Modificado de Chistiakov D.A) [67].

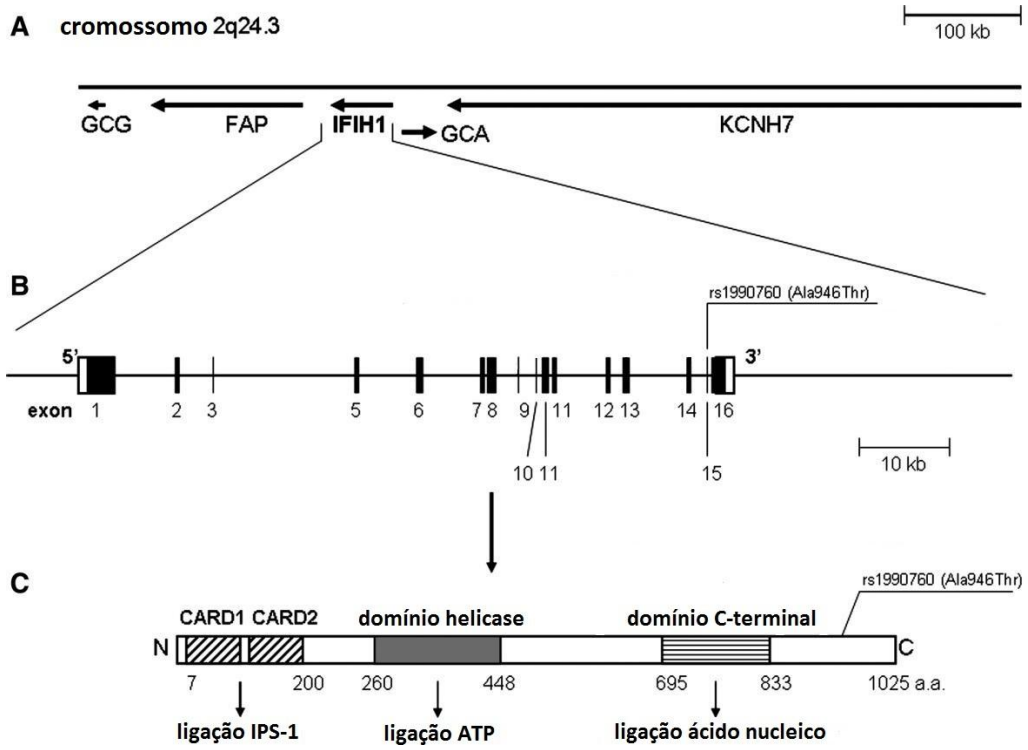

Figura 10 - (A) Organização genômica do cromossomo 2q 24.3: genes IFIH1, glucagon (GCG), proteína de ativação do fibroblasto (FAP-a), grancalcin (GCA) e do canal de potássio e da subfamília H (KCNH7); (B) e (C) Estrutura do gene IFIH1 e localização do polimorfismo (Modificado de Chistiakov D.A) [67].

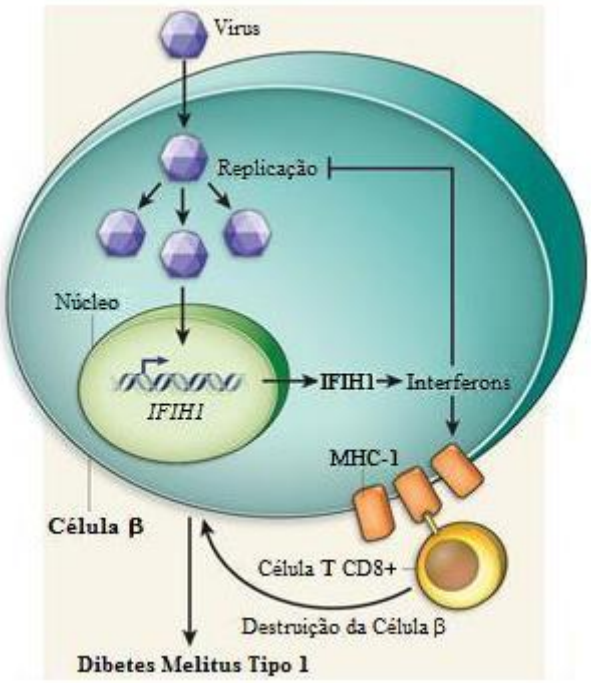

Figura 11 - Representação do processo de infecção viral e a resposta de interferon no DM1. Na infecção viral, o *IFIH1* é ativado nas células pancreáticas produtoras de insulina, aumentando os níveis de interferon. Ocorre então a inibição da replicação viral, mas também aumenta a expressão de moléculas MHC-I. As células T reconhecem as moléculas MHC-I na superfície, danificando a célula pancreática até a destruição, resultando em DM1 (Modificado de Von Herrath M.) [69].

Recentemente, um estudo realizado por Smyth et al. mostrou que o polimorfismo no éxon 14 do gene *IFIH1* está associado a DM1. Este polimorfismo leva a troca de C por T na posição 3058, causando a mudança de alanina por treonina no códon 946 (A946T, rs1990760) (Figura 10). É possível observar uma correlação positiva associada ao alelo A em aproximadamente 10.000 pacientes com DM1 representados por pai, mãe e filho com a doença[70]. Em populações húngara e finlandesa com DM1, o alelo A é significativamente mais comum nos doentes do que nos controles (OR: 1,235; IC: 1,083-1,408; p= 0,002)[71].

Liu et al. encontraram um aumento na expressão de *IFIH1* em células mononucleares periféricas, que apresentavam este polimorfismo, associado a alto risco de DM1 [72]. Em contrapartida, em uma população belga não foi possível observar diferença significativa na presença do alelo A entre os pacientes com DM1 e os controles [73].

Sutherland et al. também descreveram a presença do alelo A em 66% dos pacientes com DG e em 57% do grupo controle (OR: 1,47 e IC: 1,23-1,76)[74]. Por outro lado, Penna-Martinez et al. não observaram diferença significativa entre as frequências alélica e genotípica do polimorfismo A946T entre pacientes com DG, TH e o grupo controle [75]. O achado de uma possível associação do alelo patogênico do *IFIH1* com DG, sem indícios de ser desencadeada por infecção viral, sugere que o *IFIH1* pode ter um efeito na imunorregulação endógena não relacionada com o receptor para o RNA viral.

Considerando que as frequências dos polimorfismos variam de acordo com a população estudada e com a necessidade de replicar os estudos para confirmar ou descartar as associações, esse trabalho propôs estudarmos genes sabidamente envolvidos na DAIT em pacientes acometidos em uma fase precoce, na infância e adolescência.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Determinar a frequência alélica de polimorfismos nos genes *CTLA4* (-318C/T, A49G e CT60), *PTPN22* (R620W) e *IFIH1* (A946T) em pacientes pediátricos portadores de doença de Graves, tireoidite de Hashimoto e DM1 associado à tireoidite de Hashimoto e comparar com uma população controle normal;

2. Comparar as frequências dos polimorfismos entre os grupos;

3. Relacionar as variações genotípicas com características clínicas e laboratoriais dos pacientes.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

PACIENTES

Todos os pacientes selecionados apresentaram o diagnóstico de doença de Graves, tireoidite de Hashimoto e DM1 até os 21 anos de idade. Os pacientes foram avaliados através de questionário, exame clínico e revisão de prontuário médico (Anexo 1). O período de coleta de dados foi de agosto de 2009 até dezembro de 2011.

Os pacientes ou responsáveis legais foram esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos desse projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo 2).

Este Projeto teve aprovação do Comitê de Ética da CAPPesq número 1101/08 e apoio financeiro da Fundação de Amparo a pesquisa do estado de São Paulo número 1737-7 (Anexo 3).

Fizeram parte do estudo, pacientes provenientes de quatro serviços:

- Ambulatório do Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança (ICr), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP;
- Ambulatório de Diabetes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP),
- Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp),
- Ambulatório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRPUSP).

Os pacientes foram divididos em 3 grupos, além do grupo controle:

- Grupo 1: pacientes com DG documentada pelas características clínicas (bócio difuso e exoftalmia) e a presença de hormônios tireoidianos elevados (tireotoxicose), TSH suprimido (TSH < 0,05 mU/L) e/ou TRAb elevado (> 20%) [9].

- Grupo 2: pacientes com TH, determinada pela presença de anticorpo anti-TPO a qualquer tempo (> 100 U/L), associado ou não a hipotireoidismo e/ou bócio e/ou atrofia tireoideana [11].

- Grupo 3: pacientes com DM1 associado a TH, demonstrado pela ocorrência de hiperglicemia, com cetoacidose ao diagnóstico e presença de anticorpos anti-GAD, IA2 e IAA, com anti-TPO presente (valores > 100 U/L) a qualquer tempo, apresentando ou não hipotireoidismo e/ou bócio e/ou atrofia tireoidea.

- Grupo 4: grupo controle constituído de indivíduos adultos (> 18 anos) com função tireoidiana normal, ausência de anticorpos anti-TPO e ausência de DM1, que já fazem parte de um banco de amostras coletadas e armazenadas (CAPPesq 0561/07).

Para fins de comparação denominamos grupo de doenças autoimunes da tireoide (DAIT), todos os pacientes estudados (grupos 1+2+3) e grupo de tireoidite de Hashimoto agrupado, todos os pacientes dos grupos 2 e 3.

Foram excluídos do estudo pacientes sem determinação do início da doença e diagnóstico após os 22 anos de idade, assim como pacientes portadores de cromossomopatia (síndrome de Down, síndrome de Turner, entre outras), doenças tireoidianas ou diabetes causadas por etiologia não autoimune (uso de drogas, hipotireoidismo congênito, hipotireoidismo central, nesidioblastose pós tratamento, entre outras).

DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES SELECIONADOS

Foram avaliados em todos os pacientes: gênero, características de cor da pele, idade ao diagnóstico das doenças, bócio e exoftalmia, e presença de outras DAI referidas na família.

Dosagens hormonais e autoimunidade:

Foram dosados T4 livre (T4L), TSH e anti-TPO usando *kits* comerciais por fluoroimunoensaio ou quimioluminescência. O anticorpo contra o receptor

do TSH (TRAb) foi dosado através de radioimunoensaio (RSR, Cardiff, Inglaterra) (Tabela 2).

Os autoanticorpos anti-GAD e IA2 foram dosados através de radioimunoensaio (RSR, Cardiff, Inglaterra) e IAA através de radioimunoensaio.

EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO

O DNA genômico foi extraído a partir de amostra de sangue periférico (10 mL) coletado em tubo contendo EDTA utilizando o método *salting out*. O sangue foi incubado em solução de lise de glóbulos vermelhos (114 mM cloreto de amônia; 1 mM carbonato de amônia) durante 30 minutos à 4°C. Após este período, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm/15 minutos/4°C. O sobrenadante foi descartado e o botão de células dissolvido em solução tampão (100 mMNaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8) contendo 1% de SDS e 0,2 mg/mL de proteinase K e incubando-se a 37°C durante a noite. No dia seguinte, foram acrescentados 1,2 mL de NaCl e a amostra foi centrifugado 3.000 rpm/15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo falcon utilizando pipeta Pasteur, adicionando-se duas vezes o volume de etanol absoluto gelado. O tubo foi invertido até completa precipitação do DNA, o qual “floculou” no etanol. O DNA foi então removido com anzol de vidro e lavado com etanol 70% (4 vezes) e por último com etanol absoluto. O *pellet* de DNA seco a temperatura ambiente, foi transferido para um tubo tipo *eppendorf* onde foi homogeneizado em cerca de 1 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0). O DNA extraído foi conservado a -4ºC até a sua utilização.

AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE GENOTIPAGEM

Os polimorfimos estudados -318C/T, A49G, CT60 (gene *CTLA4*), R620W (gene *PTPN22*) e A946T (gene *IFIH1*) foram genotipados por PCR em tempo real utilizando ensaios TaqMan® (Applied Byosistem, Foster City, CA, EUA) disponíveis comercialmente (Tabela 2).

No sistema de genotipagem TaqMan®, os ensaios são compostos por duas sondas, especificas para cada alelo polimórfico, e um par de oligonucleotídeos que flanqueia essas sondas. Cada sonda é construída contendo um corante reporter fluorescente em sua extremidade 5´ (VIC® e FAM™, respectivamente para as sondas dos alelos 1 e 2, azul e vermelho) e um corante silenciador (*quencher*) em sua extremidade 3´ (Tabela 3). Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz a emissão de fluorescência do corante reporter. Em presença da sequência alvo ocorre o anelamento da sonda ao DNA, que é posteriormente clivada durante a amplificação por PCR, levando, com isso, a liberação do *quencher* a emissão do sinal fluorescente pela molécula reporter.

Tabela 2 - Identificação dos polimorfismos, incluindo seus respectivos ensaios de genotipagemTaqMan® , dos genes CTLA4, PTPN22 e IFIH1 estudados nos pacientes com DG, TH e DM1.

Gene	**Polimorfismo**	**SNP**	**Ensaio TaqMan®**
CTLA4	-318 C/T	rs5742909	ID C_27834180_10
	A49G	rs231775	ID C_2415786_20
	CT60	rs3087243	ID C_3296043_10
PTPN22	R620W	rs2476601	ID C_16021387_20
IFIH1	A946T	rs1990760	ID C 2780299_30

SNP: *single nucleotide polimorphism*; ID: identificação do ensaio

Tabela 3 - Correlação com o sinal de fluorescência na técnica de genotipagem TaqMan® utilizada.

Fluorescência	Indicação
Corante VIC® - azul	Homozigose para o alelo 1
Corante 6FA – vermelho	Homozigose para o alelo 2
Ambos os corantes	Heterozigose para alelo 1 e 2

A reação foi realizada contendo 2,5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems,EUA), 0,15 µL de cada ensaio TaqMan®

genotyping assays (Applied Biosystem, EUA) diluído em 0,15 uL de TE, 3µL de água mili-Q, 10 ng de DNA, numa concentração de 10 ng/uL. A PCR em tempo real foi feita no equipamento StepOne Plus® (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), utilizando as condições descritas na Tabela 4.

A presença ou ausência de um alelo (discriminação alélica) foi determinada com o auxilio do software StepOne Plus® (Life Technologies, Foster City, CA, EUA), já incluso no sistema e de acordo com a fluorescência gerada no final da reação de PCR (Figura 12) ou pela curva de amplificação das amostras (Figura 13).

Tabela 4 - Condições da reação de genotipagem por PCR em tempo real.

Etapa	Tempo	Temperatura	
	10 min	95 °C	
Desnaturação	15 seg	92 °C	x 40 ciclos
Anelamento	1 min	60 °C	
Extensão	1 min	60 °C	

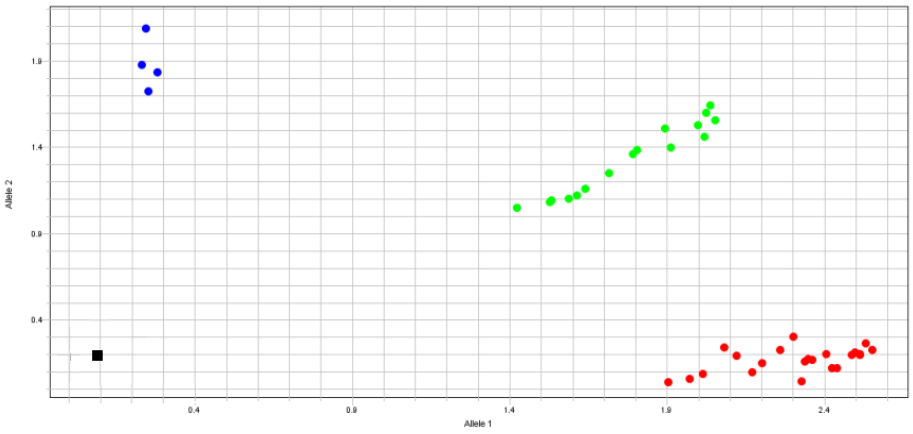

Figura 12 - Exemplo de gráfico de discriminação alélica através do sistema TaqMan®. Alelo 2: homozigoto, Alelos 1/2: heterozigoto, Alelo 1: homozigoto

A genotipagem por PCR em tempo real foi realizada conforme descrição e amostras aleatórias foram submetidas a sequenciamento automático, confirmando os resultados obtidos.

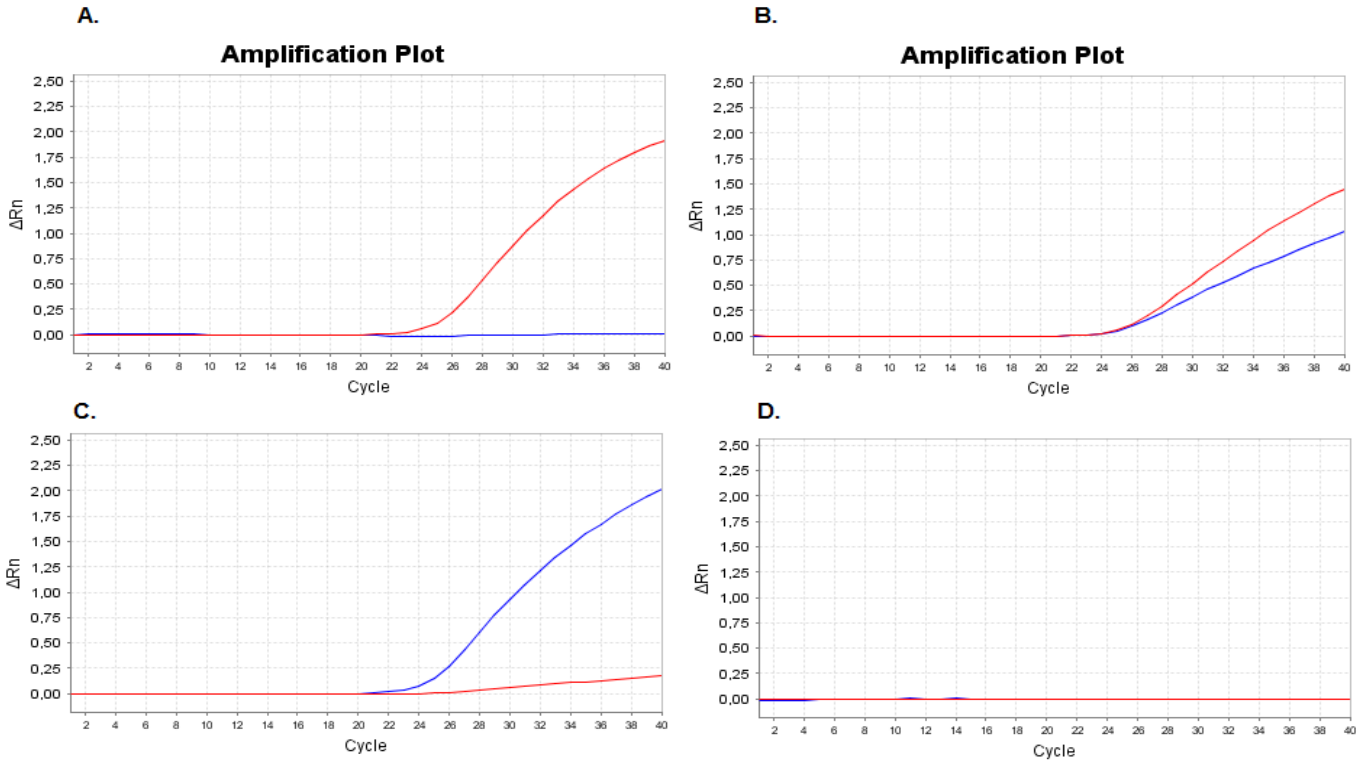

Figura 13 - Curva da amplificação de amostras submetidas a genotipagem através do sistema TaqMan®. (A) Homozigoto para o alelo 1, (B) Heterozigoto (1/2), (C) Homozigoto para o alelo 2, (D) Controle negativo da reação.

ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DOS ALELOS E GENÓTIPOS

Avaliamos a frequência de cada variante alélica de cada polimorfismo nos diferentes grupos, assim como a presença do alelo patogênico no genótipo de cada paciente. Denominamos genótipo patogênico a presença do alelo patogênico em homo ou heterozigose e genótipo não patogênico, a presença do alelo não patogênico em homozigose.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média ± DP. As frequências dos alelos e a frequência dos genótipos foram determinadas em cada grupo, DAIT (grupos 1+2+3) e tireoidite de Hashimoto agrupado (grupos 2+3) e comparado ao grupo controle. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado para cada polimorfismo através do teste qui-quadrado. As comparações de cada variável entre os grupos 1, 2 e 3 foram feitas através do teste de Fisher, qui-quadrado e Mann-Whitney quando apropriado. Valores de $p<0,05$ foram considerados significantes e calculados através do programa SPSS com auxílio de estatístico.

RESULTADOS

CASUÍSTICA

De setembro de 2009 a setembro de 2011, foram realizadas as coletas de dados e de DNA. Nossa casuística compreendeu:

- Grupo 1: 62 pacientes com doença de Graves, sendo provenientes do ICr 21 pacientes, HC-FMUSP 9 pacientes, Unicamp13 pacientes e HC-FMRP-USP 19 pacientes;
- Grupo 2: 44 pacientes com tireoidite de Hashimoto, sendo provenientes do ICr 41 pacientes e do HC-FMUSP 3 pacientes;
- Grupo 3: 36 pacientes com DM1 associado a tireoidite de Hashimoto, sendo provenientes do ICr 17 pacientes e os demais do HC-FMUSP.
- Grupo controle: 81 indivíduos

Os dados clínicos de cada grupo estudado estão apresentados na tabela 5.

1. GRUPO 1: DOENÇA DE GRAVES

Do total de 62 pacientes com DG, 68% (n=43) eram do sexo feminino, com idade média ao diagnóstico de 11,4 anos (DP±4,4 anos), variando de 3 a 21 anos (mediana=10,5 anos). Ao diagnóstico, 43 pacientes apresentaram TSH < 0,05 mU/L e 35 apresentavam TRAb positivo. Os demais pacientes apresentaram claramente, em algum momento de sua evolução, TSH suprimido e/ou T4L elevado e tireotoxicose clínica. A média de T4L ao diagnóstico foi 6,52 ng/dL. A presença de oftalmopatia clínica foi observada em 62% (n=39). Glândula aumentada pela avaliação de ultrassonografia, caracterizando a presença de bócio, foi diagnosticada em 44,4% dos pacientes (n=28) [76].

A média de tempo de uso de DAT foi de 35,4 meses, variando de 1 mês até 132 meses durante a coleta de dados. Radioiodoterapia (RIT) foi realizada em 40% dos pacientes (n=25), que receberam dose média de 17 mCi. A média de tempo do início do tratamento com DAT até a realização do

tratamento definitivo com RIT foi de 44 meses (DP=25 meses). Apenas 3 pacientes necessitaram de nova dose de RIT por recidiva da doença. A primeira dose de RI empregada nestes pacientes com recidiva foi de 9, 10 e 10 mCi, seguida de uma segunda dose de 30, 20 e 20 mCi respectivamente. Nenhum paciente foi submetido a tratamento cirúrgico.

Quatro pacientes apresentavam diagnóstico de outra doença autoimune (DAI) concomitante: dois pacientes apresentavam vitiligo, um paciente com hepatite autoimune e um com lúpus eritematoso sistêmico. Seis pacientes apresentavam história familiar de DAIT em parente de 1º grau, com a mãe acometida por DG (n=3) e por TH (n=3).

2. GRUPO 2: TIREOIDITE DE HASHIMOTO

Do total de 44 pacientes com TH, 37 pacientes (84%) eram do sexo feminino, com média de idade ao diagnóstico de 10,3 anos (DP±2,9 anos), variando de 4,4 a 17,5 anos (mediana=10,3 anos). Vinte e dois pacientes (50%) apresentavam TSH > 10 mUI/L ao diagnóstico. A média de TSH ao diagnóstico foi 34,8 mUI/L (variação de 1,7 a 150 mUI/L). O nível de anti-TPO variou de 100 até maior que 3.000 U/mL. Dez pacientes (22,7%) apresentavam a glândula aumentada quando avaliada por ultrassonografia, caracterizando bócio [76]. Somente 3 pacientes (14%) apresentavam-se em eutireoidismo e sem o uso da levotiroxina no momento do estudo. Os valores de anti-TPO destes pacientes foram 722, 110 e 144 U/mL no momento do diagnóstico e estão em seguimento.

Seis pacientes (13,6%) apresentavam outra DAI concomitante à tireoidite de Hashimoto: alopécia (n=2), hepatite autoimune (n=1), artrite reumatóide juvenil (n=1), vitiligo (n=1) e uma paciente apresentava alopecia associada ao vitiligo. Antecedentes familiares de DAIT foram relatados em 19 parentes de primeiro grau de 13 pacientes com TH, sendo 1 caso de mãe com DG, 12 irmãos e 5 mães e 1 pai com TH.

3. GRUPO 3: DM1 E TH

Do grupo de 36 pacientes com DM1 associado à TH, a média de idade do diagnóstico de DM1 foi 6,2 anos (DP±4 anos), variando de 0,6 a 13,9 anos,

enquanto a média de idade do diagnóstico da TH foi de 11,6 anos (DP±4,6 anos), variando de 1 a 20,1 anos. Seis pacientes (16,6%) apresentavam bócio quando avaliados por ultrassonografia. Dez pacientes (27,7%) apresentavam TSH > 10 mUI/L ao diagnóstico. Os valores de anti-PO variaram de 183 até maior que 3.000 U/mL. Oito pacientes (22%) estavam em eutireoidismo, apresentavam níveis elevados de anti-TPO (entre 130 mUI/L e 3000 mUI/L) e não utilizavam levotiroxina no momento do estudo. Um paciente apresentou diagnóstico de doença celíaca concomitante e um paciente apresentou insuficiência adrenal secundária devido à hipofisite. Dois pacientes tinham história familiar de hipotireoidismo autoimune (mãe e irmão).

Com relação aos anticorpos relacionados ao DM1, 44,4% dos pacientes (n=16) apresentaram anti-GAD positivo; 30,5% (n=11) apresentaram anti-IA2 positivo e 55,5% (n=20) apresentaram IAA positivo.

4. GRUPO CONTROLE

O grupo foi constituído por 81 indivíduos, provenientes do Banco de Sangue do Hospital do Servidor Público Estadual. Todos apresentavam função tireoidiana normal, anticorpos antitireoidianos negativos e ausência de DM1. A média de idade foi 34 anos (DP±10 anos), variando de 19 até 56 anos. Trinta e três indivíduos eram do sexo masculino (40,7%).

A freqüência do sexo feminino foi maior em todos os grupos estudados. A tabela 5 mostra os dados clínicos de cada grupo estudado.

Não observamos diferença significativa ao compararmos sexo entre os grupos 1 e 2, entre os grupos 1 e 3 e entre os pacientes com doença de Graves e tireoidite de Hashimoto agrupado (grupos 1+2+3).

Comparando a idade do diagnóstico da DAIT, não houve diferença entre os pacientes com doença de Graves (grupo 1) em comparação com tireoidite de Hashimoto (grupo 2) ou DM1 associado a tireoidite de Hashimoto (grupo 3). Não observamos diferença estatística na idade ao diagnóstico entre os pacientes dos grupos 2 e 3 (Figura 14).

Tabela 5 - Dados clínicos dos grupos estudados.

	Doença de Graves	Tireoidite de Hashimoto	DM1 + Tireoidite de Hashimoto	Controles
Número de pacientes	62	44	36	81
Idade ao diagnóstico (x± DP em anos)	10,8 ± 4,4	10,3 ± 2,9	DM1: 6,2 ± 4 TH: 11,6 ± 4.6	34 ± 10
Variação	3-21	4,4-17,5	0,6-13,9 1-20,1	19-56
Sexo F:M	43:19	37:7	21:15	48:33
Raça (brancos:não brancos)	44:18	28:16	28:8	73:8
Bócio ao exame físico	42/62	14/44	6/36	
Doença autoimune associada	4[a]	6[b]	2[c]	
Antecedentes familiares de DAIT	6/62[d]	19/44[e]	2/36[f]	

[a] Lupus eritematoso sistêmico (n=1), vitiligo (n=2), hepatite autoimune (n=1); [b] Hepatite autoimune (n=1), artrite reumatoide juvenil (n=1), vitiligo (n=2), alopécia areata (n=3); [c] Doença celíaca (n=1) e hipofisite autoimune (n=1);

[d] Tireoidite de Hashimoto (n=3) e doença de Graves (n=3); [e] Tireoidite de Hashimoto (n=18), Doença de Graves (n=1); [f] tireoidite de Hashimoto (n=2).

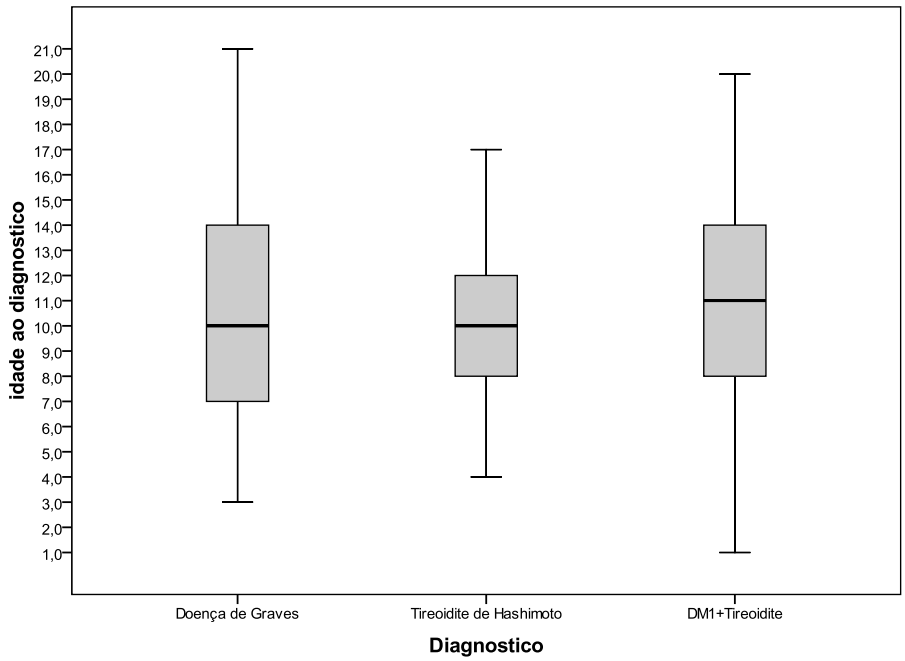

Figura 14 - Distribuição da idade do diagnóstico dos pacientes com doença de Graves, tireoidite de Hashimoto e DM1 associado a tireoidite de Hashimoto (teste de Mann-Whitney).

Os valores de anti-TPO nos grupos 2 e 3 apresentaram mediana de 704 e 799 U/mL, respectivamente e não apresentaram diferença significativa (p=0,886) (Figura 15).

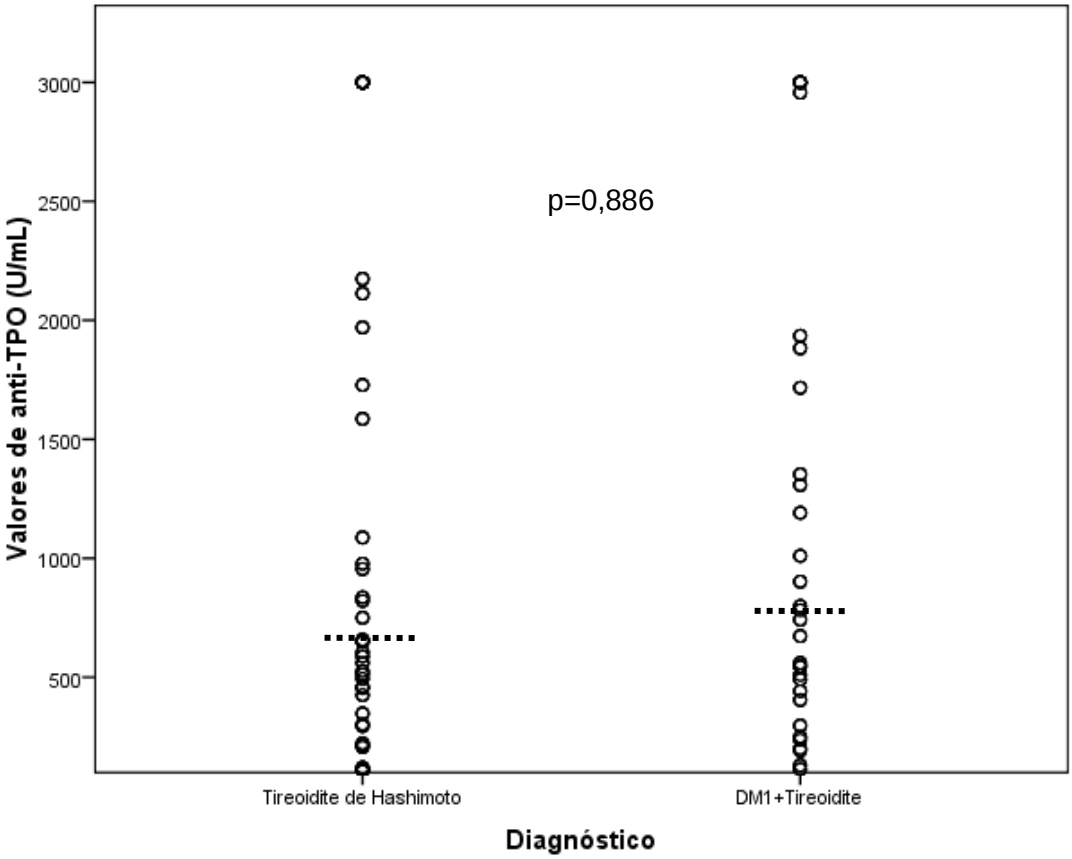

Figura 15 - Distribuição dos valores de anti-TPO nos grupos 2 (tireoidite de Hashimoto) e 3 (DM1 associado a tireoidite de Hashimoto). A linha tracejada representa a mediana encontrada.

EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM

A extração de DNA foi realizada em todos os pacientes e controles a partir de leucócitos obtidos de sangue periférico. Todas as amostras apresentaram qualidade para a realização da genotipagem.

A genotipagem por PCR em tempo real foi realizada conforme descrição e amostras aleatórias foram submetidas à sequenciamento automático, confirmando os resultados obtidos.

FREQUÊNCIAS DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS

Todos os polimorfismos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

1. POLIMORFISMOS DO GENE *CTLA4*

As tabelas 6, 7 e 8 mostram as frequências encontradas dos genótipos e dos alelos nos respectivos grupos.

Não encontramos associação do alelo patogênico (T) e dos genótipos patogênicos (CT e TT) dos polimorfismos -318C/T do *CTLA4* em todos os grupos estudados em comparação ao grupo controle (tabela 6).

Tabela 6 - Frequências do polimorfismo -318C/T do *CTLA4* nos grupos estudados de acordo com os alelos e genótipos.

.

	Alelo patogênico (**T**)	Alelo não patogênico (C)	p	Genótipo patogênico (C**T** e **TT**)	Genótipo não patogênico (CC)	p
DAIT	27 (9,5%)	257 (90,5%)	0,41	25 (17,6%)	117 (82,4%)	0,299
DG	9 (7,2%)	115 (92,8%)	0,87	9 (14,5%)	53 (85,5%)	0,705
TH	11 (12,5%)	77 (87,5%)	0,12	10 (22,7%)	34 (77,3%)	0,131
DM1+TH	7 (9,7%)	65 (90,3%)	0,43	6 (16,6%)	30 (8,4%)	0,530
TH agrupado	18 (11,2%)	142 (88,8%)	0,16	16 (20%)	64 (80%)	0,187
Controle	11 (6,2%)	151 (93,8%)		10 (12,3%)	71 (87,7%)	

DAIT: doença autoimune da tireoide; DG: doença de Graves; TH: tireoidite de Hashimoto; DM1+TH: DM1 associado a tireoidite de Hashimoto, TH agrupado: grupos 2+3; teste qui-quadrado

Encontramos associação do alelo patogênico (G) do polimorfismo A49G do *CTLA4* em todos os grupos estudados, exceto no grupo 1 (doença de Graves) (tabela 7). Entretanto, a associação do genótipo patogênico só foi observada quando consideramos o grupo DAIT (grupos 1+2+3) e os pacientes do grupo 1 (doença de Graves), atribuindo um risco 1,9 e 1,3 vezes, respectivamente (tabela 7 e figuras 16 e 17).

Tabela 7 - Frequências do polimorfismo A49G do *CTLA4* nos grupos estudados de acordo com alelos e genótipos.

	Alelo patogênico (**G**)	Alelo não patogênico (A)	p OR **[95% IC]**	Genótipo patogênico (A**G** e **GG**)	Genótipo não patogênico (AA)	p OR **[95% IC]**
DAIT	126 (44,3%)	158 (55,7%)	**0,016 [1,356; 1,049-1,752]**	97 (68,3%)	45 (31,7%)	**0,024 [1,905; 1,086- 3,340]**
DG	53 (42,7%)	71 (57,3%)	0,082	43 (69,3%)	19 (30,7%)	**0,049 [1,306; 1,004-1,700]**
TH	40 (45,4%)	48 (54,6%)	**0,047 [1,389; 1,011-1,910]**	30 (68,2%)	14 (31,8%)	0,102
DM1+TH	33 (45,8%)	39 (54,2%)	**0,055 [1,401; 1,003-1,957]**	24 (66,6%)	12 (33,4%)	0,171
TH agrupado	87 (54,3%)	73 (45,7%)	**0,018 [1,395; 1,056-1,842]**	54 (67,5%)	26 (32,5%)	0,062
Controle	53 (32,7%)	109 (67,3%)		43 (53,1%)	38 (46,9%)	

DAIT: doença autoimune da tireoide; DG: doença de Graves; TH: tireoidite de Hashimoto; DM1+TH: DM1 associado a tireoidite de Hashimoto, TH agrupado: grupos 2+3; teste qui-quadrado

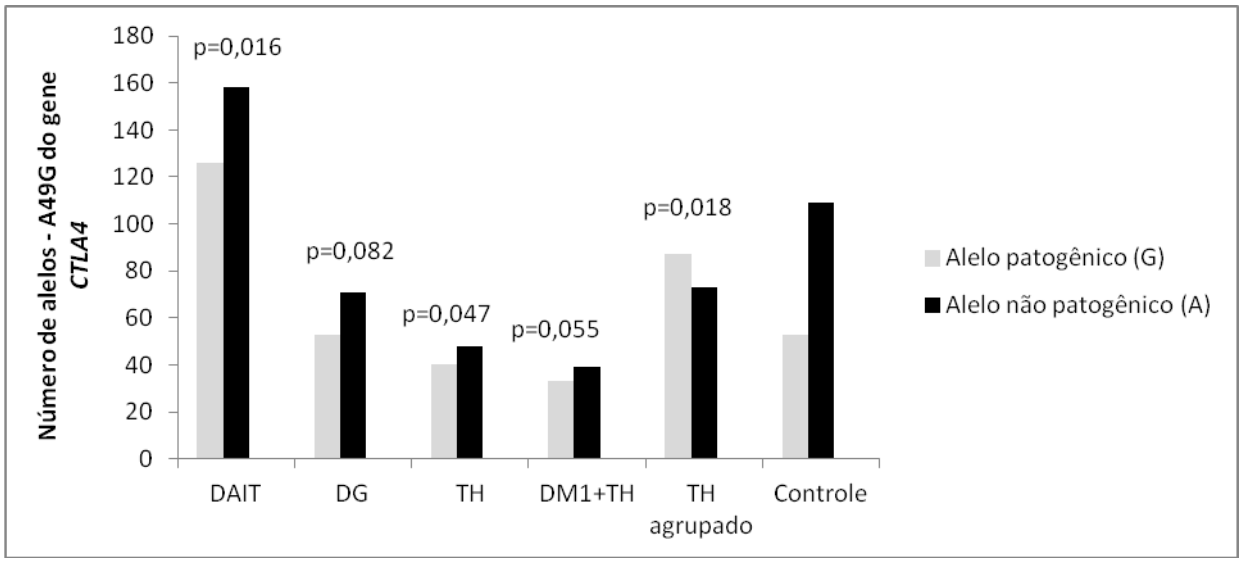

Figura 16 - Frequência dos alelos patogênico (G) e não patogênico (A) do polimorfismo A49G do CTLA4 nos grupos doença autoimune da tireoide (DAIT), doença de Graves (DG), tireoidite de Hashimoto (TH), DM1 associado a TH (DM1+TH) e tireoidite agrupado (TH agrupado) e grupo controle (teste qui-quadrado).

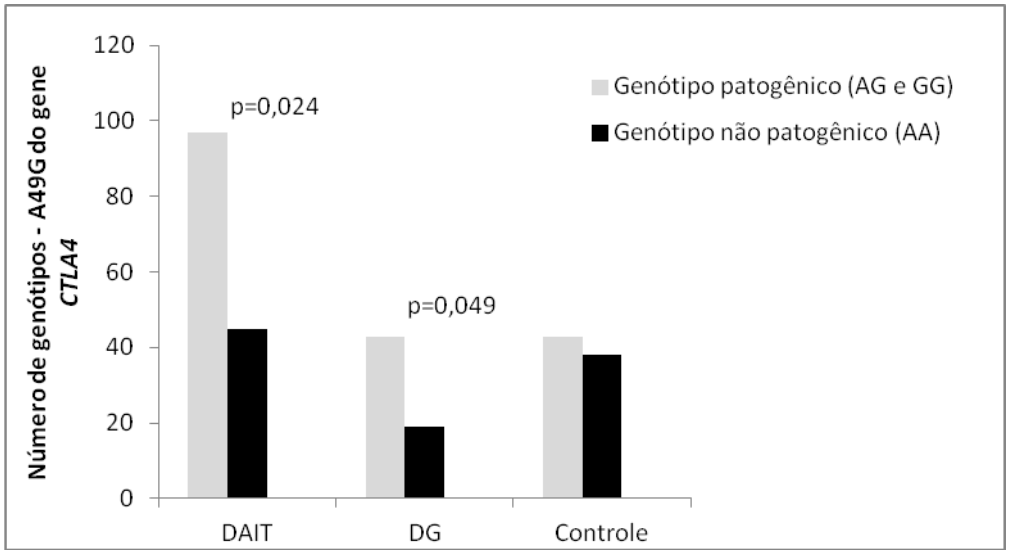

Figura 17 - Frequências dos genótipos patogênicos (AG e GG) e não patogênico (AA) do polimorfismo A49G do CTLA4 nos grupos doença autoimune da tireoide (DAIT) e doença de Graves (DG) e grupo controle (teste qui-quadrado).

Encontramos associação do alelo patogênico (G) do polimorfismo CT60 do *CTLA4* apenas com o grupo 1 (doença de Graves) (tabela 8 e figura 18). Entretanto, não observamos associação do genótipo patogênico em todos os grupos estudados quando comparados ao grupo controle (tabela 8).

Tabela 8 - Frequências do polimorfismo CT60 do *CTLA4* nos grupos estudados de acordo com alelos e genótipos.

	Alelo patogênico (**G**)	Alelo não patogênico (A)	p OR **[95% IC]**	Genótipo patogênico (A**G** e **GG**)	Genótipo não patogênico (AA)	p
DAIT	188 (66,2%)	96 (33,8%)	0,085	128 (90,1%)	14 (9,9%)	0,397
DG	87 (70,2%)	37 (29,8%)	**0,035** **[1,209; 1,016-1,439]**	58 (93,5%)	4 (6,5%)	0,270*
TH	60 (68,2%)	28 (31,8%)	0,115	40 (81%)	4 (9%)	0,572*
DM1+TH	41 (57%)	31 (43%)	0,877	30 (83,3%)	6 (16,7%)	0,662
TH agrupado	101 (63,1%)	59 (36,9%)	0,349	70 (87,5%)	10 (12,5%)	0,839
Controle	94 (58%)	68 (42%)		70 (86,4%)	11 (13,6%)	

DAIT: doença autoimune da tireoide; DG: doença de Graves; TH: tireoidite de Hashimoto; DM1+TH: DM1 associado a tireoidite de Hashimoto, TH agrupado: grupos 2+3; teste qui-quadrado; teste exato de Fisher.

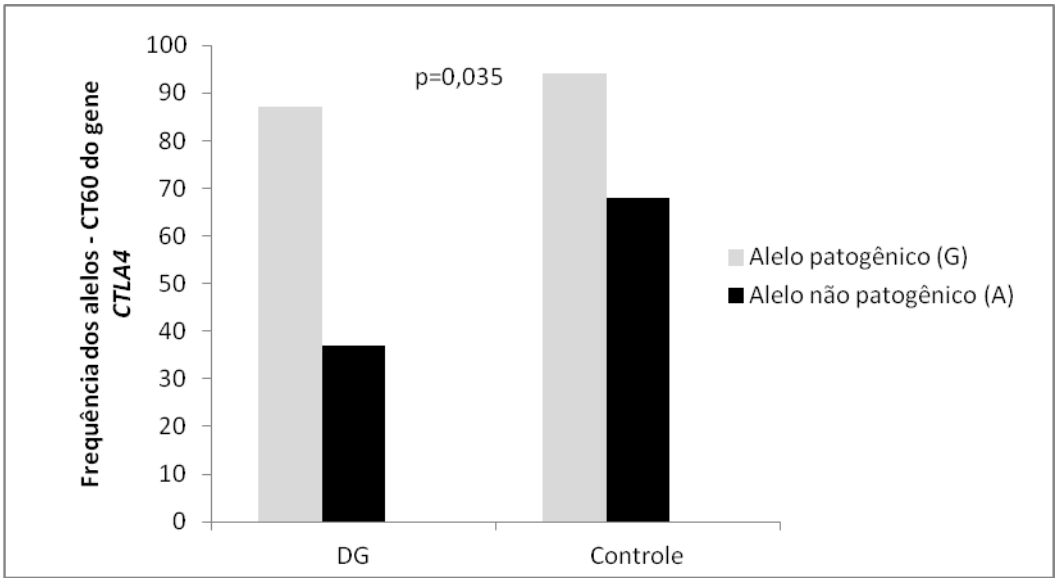

Figura 18 - Frequência dos alelos patogênico (G) e não patogênico (A) do polimorfismo CT60 do CTLA4 no grupo doença de Graves (DG) e grupo controle (p=0,035, teste qui-quadrado).

2. POLIMORFISMO R620W DO GENE *PTPN22*

Encontramos associação do alelo patogênico (T) do polimorfismo R620W do *PTPN22* no grupo 3 (DM1 associado a tireoidite de Hashimoto) e no grupo representado por DAIT (grupos 1+2+3) (tabela 9 e figura 19). Entretanto, quando analisamos os genótipos patogênicos (C**T** e **TT**), nenhuma associação significante foi encontrada com todos os grupos estudados (tabela 9).

Tabela 9 - Frequências do polimorfismo R620W do *PTPN22* nos grupos estudados de acordo com alelos e genótipos.

	Alelo patogênico (**T**)	Alelo não patogênico (C)	p OR **[95% IC]**	Genótipo patogênico (C**T** e **TT**)	Genótipo não patogênico (CC)	p
DAIT	21 (7,4%)	263 (92,6%)	**0,047*** **[2,736; 0,957-7,823]**	19 (13,4%)	123 (86,6%)	0,102*
DG	9 (7,3%)	115 (92,7%)	0,093*	9 (14,5%)	53 (85,5%)	0,085*
TH	5 (5,7%)	83 (94,3%)	0,299*	5 (11,4%)	39 (88,6%)	0,291*
DM1+ TH	7 (9,7%)	65 (90,3%)	**0,043*** **[3,597; 1,088-11,893]**	5 (13,9%)	31 (86,1%)	0,150*
TH agrupado	12 (7,5%)	148 (92,5%)	0,073*	10 (12,5%)	70 (87,5%)	0,124*
Controle	4 (2,7%)	144 (97,3%)		4 (5,4%)	70 (94,6%)	

DAIT: doença autoimune da tireoide; DG: doença de Graves; TH: tireoidite de Hashimoto; DM1+TH: DM1 associado a tireoidite de Hashimoto, TH agrupado: grupos 2+3; Teste qui-quadrado; *Teste exato de Fisher

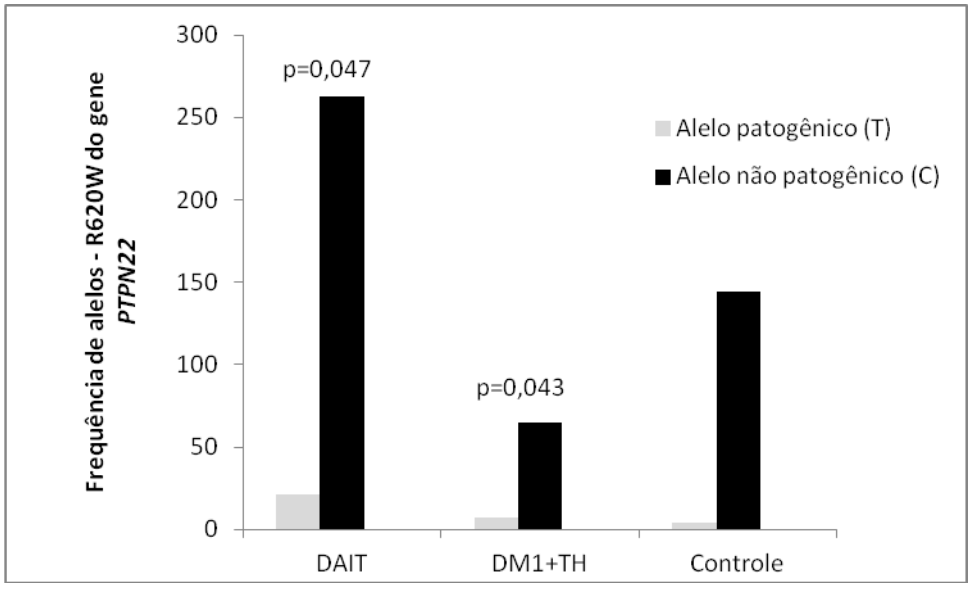

Figura 19 - Frequências de alelos patogênico (T) e não patogênico (C) do polimorfismo R620W do PTPN22 nos grupos doença autoimune da tireoide (DAIT), DM1 associado a TH (DM1+TH) e grupo controle (teste exato de Fisher).

3. POLIMORFISMO A946T DO GENE *IFIH1*

O alelo patogênico (T) do polimorfismo A946T do *IFIH1* foi associado ao grupo 3 (DM1 associado a tireoidite de Hashimoto) e ao grupo tireoidite de Hashimoto agrupado (grupos 2+3) (tabela 10 e figura 20). Os genótipos patogênicos (CT e TT) atribuíram um risco 1,4 vezes maior para grupo 3 (DM1 associado a tireoidite de Hashimoto) (p=0,007; OR: 1,435; IC: 1,138-1,810) (tabela 10 e figura 21).

Tabela 10 - Frequências do polimorfismo A946T do *IFIH1* nos grupos estudados de acordo com alelos e genótipos.

	Alelo patogênico (**T**)	Alelo não patogênico (C)	p OR **[95% IC]**	Genótipo patogênico (C**T** e **TT**)	Genótipo não patogênico (CC)	p OR **[95% IC]**
DAIT	145 (51%)	139 (49%)	0,110	100 (70,4%)	42 (29,6%)	0,129
DG	55 (44,3%)	69 (557%)	0,550	41 (66,1%)	21 (33,9%)	0,467
TH	41 (46,6%)	47 (53,4%)	0,383	28 (63,6%)	16 (36,4%)	0,698
DM1+TH	43 (59,7%)	29 (40,3%)	**0,009** **[1,467; 1,114-1,932]**	31 (86,1%)	5 (13,9%)	**0,007*** **[1,435; 1,138-1,810]**
TH agrupado	84 (53,5%)	76 (47,5%)	**0,041** **[3,597; 1,088-11,893]**	59 (74,7%)	21 (26,3%)	0,073
Controle	57 (40,7%)	83 (59,3%)		42 (60%)	28 (40%)	

DAIT: doença autoimune da tireoide; DG: doença de Graves; TH: tireoidite de Hashimoto; DM1+TH: DM1 associado a tireoidite de Hashimoto, TH agrupado: grupos 2+3; Teste qui-quadrado; *Teste exato de Fisher.

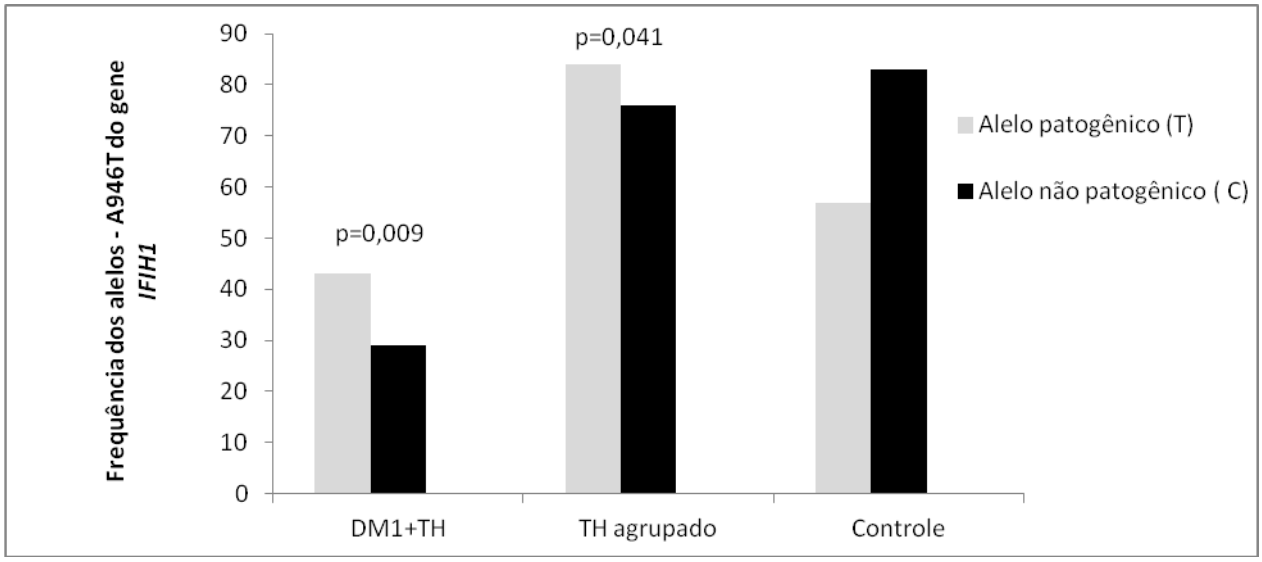

Figura 20 - Frequências dos alelos patogênico (T) e não patogênico (C) do polimorfismo A946Tdo IFIH1 no grupo DM1 associado a TH (DM1+TH), tireoidite agrupado (TH agrupado) e grupo controle (teste qui-quadrado).

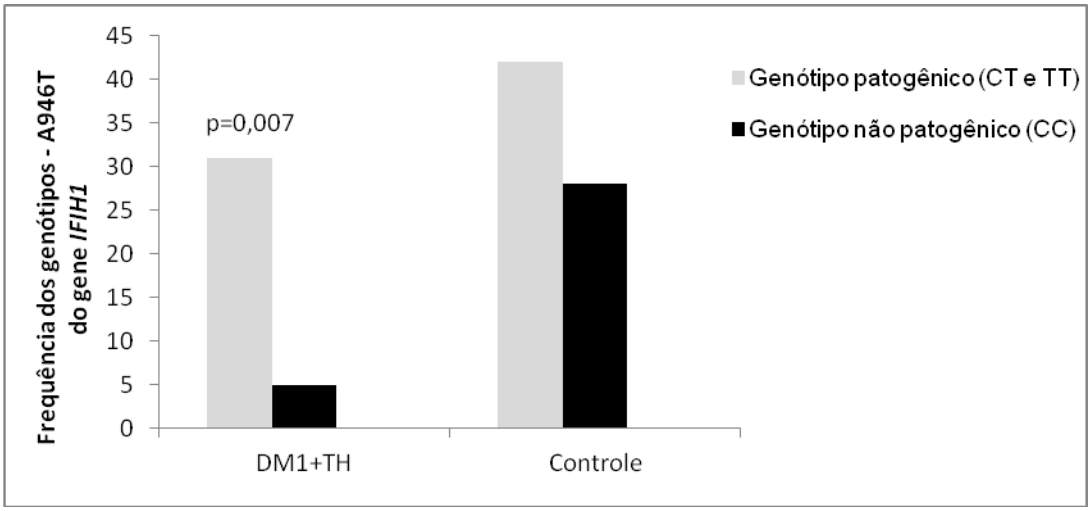

Figura 21 - Frequências dos genótipos patogênicos (CT e TT) e não patogênicos (CC) do polimorfismo A946Tdo IFIH1 nos grupos DM1 associado a TH (DM1+TH) e grupo controle (teste exato de Fisher).

Quando comparamos as frequências dos alelos e genótipos entre os grupos, observamos diferença apenas do genótipo patogênico do polimorfismo A946T do gene *IFIH1,* quando comparados os grupos 1 e 3 e os grupos 2 e 3 (p=0,031 e p=0,023, respectivamente) (tabela 11 e Figuras 22 e 23).

Tabela 11 - Análise estatística (valores de p) comparando as frequências dos alelos e genótipos entre os grupos estudados.

			Doença de Graves vs Tireoidite de Hashimoto	Doença de Graves vs DM1+Tireoidite de Hashimoto	Doença de Graves vs Tireoidite de Hashimoto agrupada	TH vs DM1+TH
CTLA4	-318 C/T	Alelo	0,198	0,544	0,255	0,580
		Genótipo	0,277	0,776	0,395	0,500
	A49G	Alelo	0,695	0,674	0,628	0,962
		Genótipo	0,898	0,783	0,814	0,886
	CT60	Alelo	0,758	0,061	0,214	0,143
		Genótipo	0,716*	0,164*	0,269*	0,333*
	PTPN22	Alelo	0,782*	0,544	0,938	0,378*
		Genótipo	0,637	0,932	0,726	0,747*
	IFIH1	Alelo	0,747	0,038	0,173	0,098
		Genótipo	0,791	**0,031**	0,324	**0,023**

Teste qui-quadrado; *teste exato de Fisher

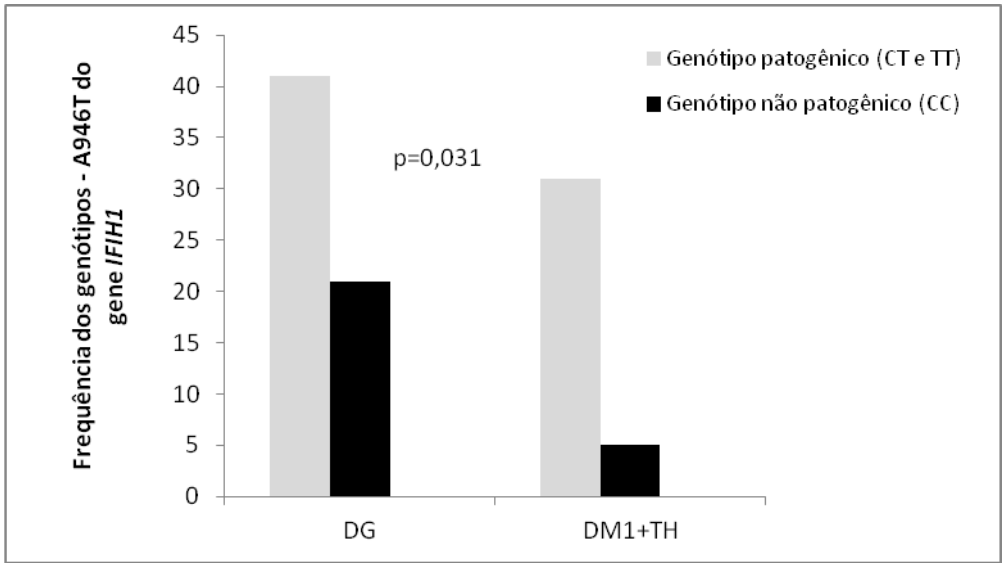

Figura 22 - Frequências dos genótipos patogênicos (CT e TT) e não patogênicos (CC) do polimorfismo A946Tdo IFIH1 no grupo doença de Graves (DG) comparado ao grupo com DM1 associado a TH (DM1+TH) (teste exato de Fisher).

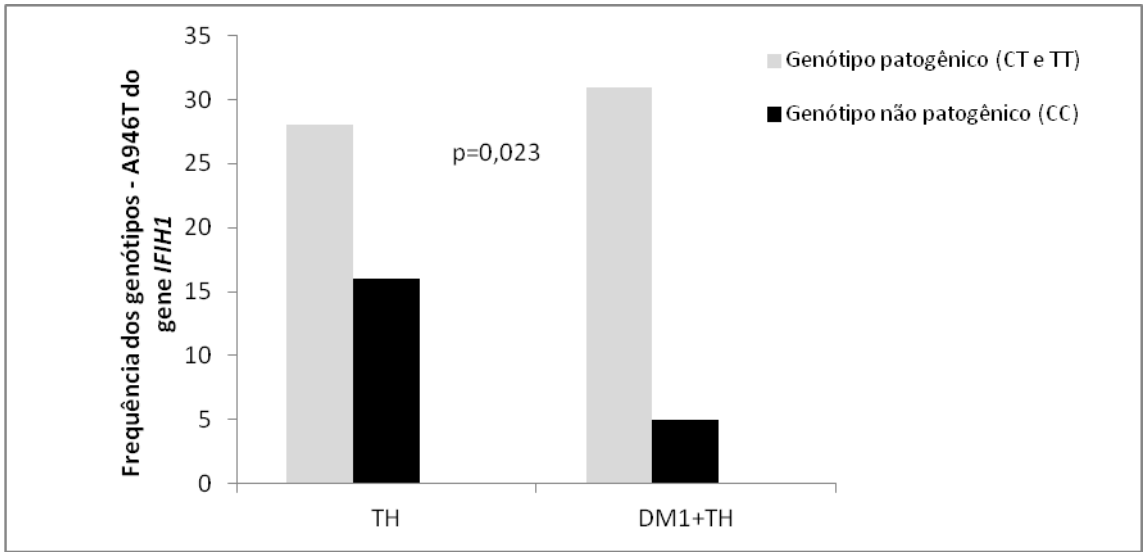

Figura 23 - Frequências dos genótipos patogênicos (CT e TT) e não patogênicos (CC) do polimorfismo A946Tdo IFIH1 no grupo tireoidite de Hashimoto comparado ao grupo DM1 associado a TH (DM1+TH) (teste exato de Fisher).

As tabelas 12 e 13 resumem os valores estatísticos de p para os genótipos e alelos de todos os polimorfismos estudados em comparação ao grupo controle.

Tabela 12 - Valores estatísticos de p para os genótipos e alelos dos polimorfismos 318C/T, A49G e CT60 do *CTLA4* em comparação ao grupo controle.

	318C/T		A49G		CT60	
	alelo	genótipo	alelo	genótipo	alelo	genótipo
DAIT	0,41	0,299	**0,016**	**0,024**	0,085	0,397
DG	0,87	0,705	0,082	**0,049**	**0,035**	0,168
TH	0,12	0,131	**0,047**	0,102	0,115	0,572*
DM1+TH	0,43	0,53	**0,055**	0,171	0,877	0,662
TH agrupado	0,16	0,187	**0,018**	0,062	0,349	0,839

DAIT: doença autoimune da tireoide; DG: doença de Graves; TH: tireoidite de Hashimoto; DM1+TH: DM1 associado a tireoidite de Hashimoto, TH agrupado: grupos 2+3; Teste qui-quadrado; *Teste exato de Fisher.

Tabela 13 - Valores estatísticos de p para os genótipos e alelos dos polimorfismos R620W do *PTPN22* e A946T do *IFIH1* em comparação ao grupo controle.

	R620W		A946T	
	alelo	genótipo	alelo	genótipo
DAIT	**0,047***	0,102*	0,11	0,129
DG	0,093*	0,085*	0,55	0,467
TH	0,299*	0,291*	0,383	0,698
DM1+TH	**0,043***	0,150*	**0,009**	**0,007***
TH agrupado	0,073*	0,124*	**0,041**	**0,073**

DAIT: doença autoimune da tireoide; DG: doença de Graves; TH: tireoidite de Hashimoto; DM1+TH: DM1 associado a tireoidite de Hashimoto, TH agrupado: grupos 2+3; Teste qui-quadrado; *Teste exato de Fisher.

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS

1. DOENÇA DE GRAVES

Não observamos associação dos polimorfismos estudados com sexo dos pacientes com DG (tabela 14). A idade média ao diagnóstico foi de 11,4 anos (tabela 7) e não observamos associação com os polimorfismos estudados (tabela 15). A exoftalmopatia esteve presente em 39 pacientes (63%) e não esteve associada aos polimorfismos estudados (tabela 16). A presença de bócio também não esteve associada aos polimorfismos estudados (tabela 17). Os valores de TRab foram determinados em 35 dos 62 pacientes e não observamos diferença entre o genótipos ou alelos patogênico e não patogênico no grupo com DG (tabela 18). Vinte e cinco pacientes dos 62 (40%) realizaram radioiodoterapia; sendo que 81% são representados pelos pacientes com genótipo patogênico que não realizaram RIT com p=0,015 (tabela 19 e figuras 24 e 25). Houve associação do alelo patogênico do polimorfismo CT60 com menor tempo de duração do tratamento medicamentoso (p=0,004) (Figura 26). A tabela 20 mostra um resumo dos dados clínicos e laboratoriais avaliados para cada polimorfismo estudado nos pacientes com DG.

Tabela 14 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com o sexo dos pacientes com doença de Graves.

		Sexo	Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	P
CTLA4	-318 C/T	M	1 (2,6)	37 (97,4)	0,273*	1 (5,2)	18 (94,8)	0,169
		F	8 (9,3)	78 (90,7)		8 (18,6)	35 (81,4)	
	A49G	M	17 (44,7)	21 (55,3)	0,765	15 (79)	4 (21)	0,375*
		F	36 (41,8)	50 (58,2)		28 (65,1)	15 (34,9)	
	CT60	M	26 (68,4)	12 (31,6)	0,778	18 (94,7)	1 (5,3)	1,00*
		F	61 (70,9)	25 (29,1)		40 (93)	3 (7)	
	PTPN22	M	3 (7,9)	35 (92,1)	1*	3 (15,8)	16 (84,2)	1,00*
		F	6 (7)	80 (93)		6 (14)	37 (86)	
	IFIH1	M	17 (44,7)	21 (55,3)	0,955	11 (57,9)	8 (42,1)	0,362
		F	38 (44,2)	48 (55,8)		30 (69,7)	13 (30,3)	

M: masculino; F: feminino; Teste qui-quadrado; * teste exato de Fisher

Tabela 15 - Associação dos polimorfismos estudados de acordo com a idade ao diagnóstico da doença de Graves.

		Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	P
CTLA4	-318 C/T	9	115	0,609	9	53	0,595
	A49G	53	71	0,570	43	19	0,175
	CT60	87	37	0,099	58	4	0,373
	PTPN22	9	115	0,069	9	53	0,060
	IFIH1	55	69	0,912	41	21	0,994

Teste de Mann-Whitney

Tabela 16 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a presença de exoftalmopatia nos pacientes com doença de Graves.

		Exoftalmo-patia	Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	Presente	7 (9)	71 (91)	0,482*	7 (17,9)	32 (82,1)	0,464*
		Ausente	2 (4,3)	44 (93,7)		2 (8,7)	21 (91,3)	
	A49G	Presente	32 (41)	46 (59)	0,615	26 (66,6)	13 (33,4)	0,550
		Ausente	21 (45,6)	25 (54,4)		17 (74)	6 (26)	
	CT60	Presente	54 (69,2)	24 (30,8)	0,768	36 (92,3)	3 (7,7)	1,00*
		Ausente	33 (71,7)	13 (28,7)		22 (95,6)	1 (4,4)	
	PTPN22	Presente	5 (6,4)	73 (93,6)	0,725*	5 (12,8)	34 (87,2)	0,715*
		Ausente	4 (8,7)	42 (91,3)		4 (17,4)	19 (82,6)	
	IFIH1	Presente	33 (42,3)	45 (57,7)	0,550	26 (66,6)	13 (33,4)	0,907
		Ausente	22 (47,8)	24 (52,2)		15 (65,2)	8 (34,8)	

Teste qui-quadrado; * teste exato de Fisher.

Tabela 17 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a presença de bócio nos pacientes com doença de Graves.

		Bócio	Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	Presente	5 (6)	79 (94)	0,468	5 (11,9)	37 (88,1)	0,453*
		Ausente	4 (10)	36 (90)		4 (20)	16 (80)	
	A49G	Presente	36 (42,8)	48 (57,2)	0,970	28 (66,6)	14 (34,4)	0,509*
		Ausente	17 (42,5)	23 (57,5)		15 (75)	5 (25)	
	CT60	Presente	61 (72,6)	23 (27,4)	0,407	41 (97,6)	1 (2,4)	0,095*
		Ausente	26 (65)	14 (35)		17 (85)	3 (15)	
	PTPN22	Presente	6 (7,2)	78 (92,8)	1,9000	6 (14,3)	36 (85,7)	1,000
		Ausente	3 (7,5)	37 (92,5)		3 (15)	17 (85)	
	IFIH1	Presente	37 (44)	47 (56)	0,920	27 (64,3)	15 (35,7)	0,657
		Ausente	18 (45)	22 (55)		14 (70)	6 (30)	

Teste qui-quadrado; * teste exato de Fisher.

Tabela 18 - Associação dos polimorfismos estudados de acordo com os valores de TRab em 35 pacientes com doença de Graves.

		Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	P
CTLA4	-318 C/T	2 (2,8)	68 (97,2)	0,230	2 (5,7)	33 (94,3)	0,227
	A49G	33 (47,1)	37 (52,9)	0,742	27 (77,1)	8 (22,8)	0,623
	CT60	47 (67,1)	23 (32,9)	0,229	33 (94,3)	2 (5,7)	0,776
	PTPN22	5 (7,1)	65 (92,9)	0,538	5 (14,3)	30 (85,7)	0,524
	IFIH1	27 (38,5)	43 (61,5)	0,781	21 (60)	14 (40)	0,787

Teste de Mann-Whitney

Tabela 19 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a realização de radioiodoterapia.

		Radioiodo terapia	Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	Sim	5 (10)	45 (90)	0,482	5 (20)	20 (80)	0.465*
		Não	4 (5,4)	70 (94,6)		4 (10,8)	33 (89,2)	
	A49G	Sim	16 (32)	34 (68)	**0,047**	13 (52)	12 (48)	**0.015**
		Não	37 (50)	37 (50)		30 (81)	7 (19)	
	CT60	Sim	35 (70)	15 (30)	0,974	23 (92)	2 (8)	
		Não	52 (70,2)	22 (29,8)		35 (94,6)	2 (5,4)	1*
	PTPN22	Sim	3 (6)	47 (94)	0,738	3 (12)	22 (88)	
		Não	6 (8,1)	68 (91,9)		6 (16,2)	31 (83,8)	0,644
	IFIH1	Sim	20 (40)	30 (60)	0,422	16 (64)	9 (36)	
		Não	35 (47,3)	39 (52,7)		25 (67,6)	12 (32,4)	0,771

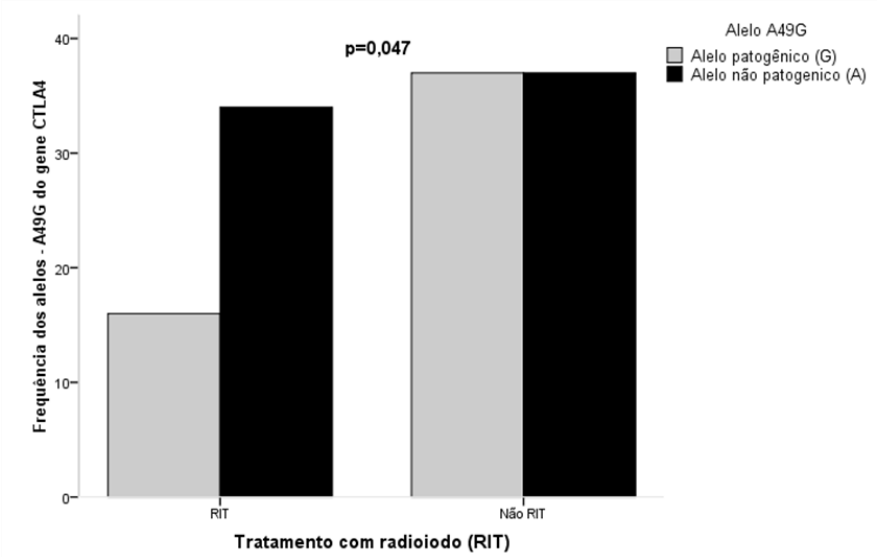

Figura 24 - Frequência dos alelos patogênico (G) e não patogênico (A) do polimorfismo A49G do CTLA4 nos pacientes com doença de Graves que receberam ou não radioiodoterapia (RIT).

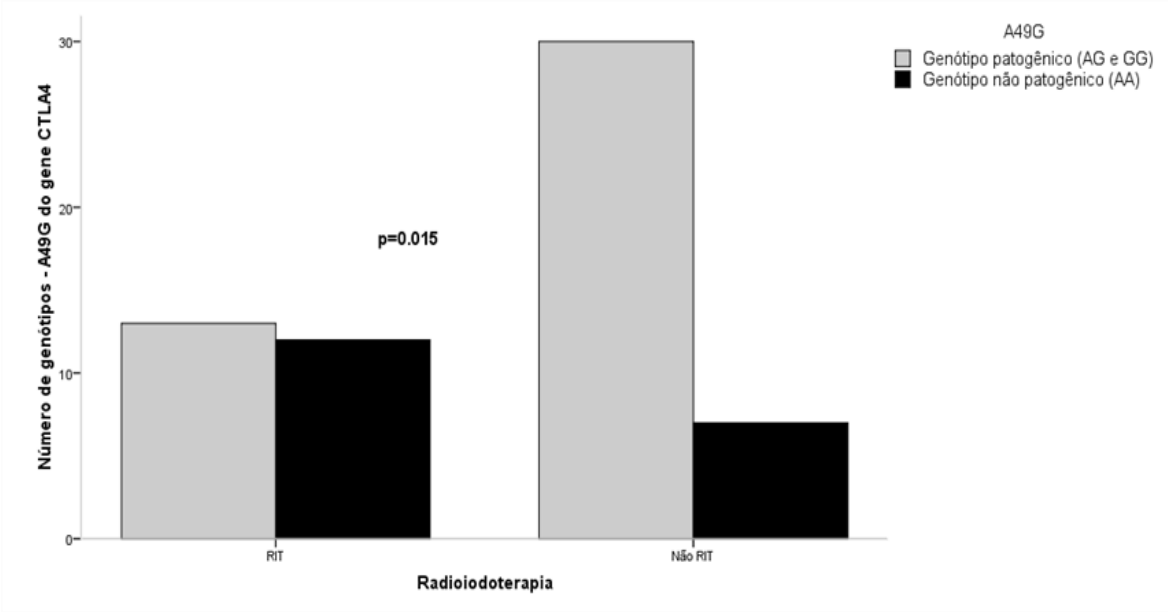

Figura 25 - Frequência dos genótipos patogênicos (AG e GG) e não patogênico (AA) do polimorfismo A49G do CTLA4 nos pacientes com doença de Graves que receberam ou não radioiodoterapia (RIT).

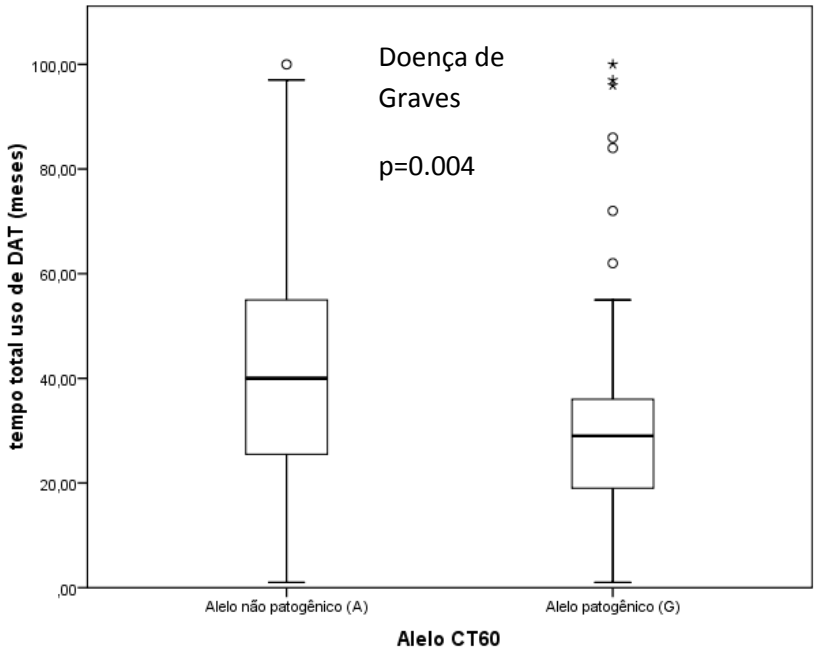

Figura 26 - Associação do tempo de uso de DAT em pacientes do grupo 1 (DG) de acordo com o alelo não patogênico e patogênico do polimorfismo CT60 do gene CTLA4.

Tabela 20 - Associação dos polimorfismos estudados com os dados clínicos e laboratoriais nos pacientes com doença de Graves.

	Polimorfismo (genótipo)	Sexo	Idade ao diagnóstico	Exoftalmopatia de Graves	Presença de bócio	TRAb	RIT
CTLA4	-318 C/T	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	A49G	NS	NS	NS	NS	NS	**0,015**
	CT60	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	PTPN22	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	IFIH1	NS	NS	NS	NS	NS	NS

TRAb: anticorpo contra o receptor de TSH. RIT: tratamento com radioiodo. NS: não significativo estatisticamente. Testes Mann-Whitney, qui-quadrado e exato de Fisher.

2. TIREOIDITE DE HASHIMOTO

Não identificamos associação de todos os polimorfismos estudados com sexo, idade ao diagnóstico, presença de bócio e valores de anti-TPO dos pacientes com tireoidite de Hashimoto (grupo 2) (Tabelas 21 a 25).

Tabela 21 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com o sexo dos pacientes com TH.

		Sexo	Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	M	3 (21,4)	11 (78,6)	0,372*	3	4	0,322*
		F	8 (10,8)	66 (89,2)		7	30	
	A49G	M	3 (21,4)	11 (78,6)	0,777*	3	4	0,184*
		F	37 (50)	37 (50)		27	10	
	CT60	M	9 (64,3)	5 (35,7)	0,760*	6	1	0,513*
		F	51 (68,9)	23 (31,1)		34	3	
	PTPN22	M	2 (14,3)	12 (85,7)	0,178*	2	5	0,173*
		F	3 (4)	71 (96)		3	34	
	IFIH1	M	6 (42,8)	8 (57,2)	0,760	4	3	0,692*
		F	35 (47,3)	39 (52,7)		24	13	

M: masculino; F: feminino; Teste qui-quadrado; * teste exato de Fisher

Tabela 22 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a idade do diagnóstico de tireoidite de Hashimoto.

		Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	11	77	0,760	10	34	0,778
	A49G	40	48	0,247	30	14	0,594
	CT60	60	28	0,014	40	4	0,108
	PTPN22	5	83	0,716	5	39	0,709
	IFIH1	41	47	0,133	28	16	0,331

Teste de Mann-Whitney

Tabela 23 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a presença de bócio nos pacientes com tireoidite de Hashimoto.

		Bócio	Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318	Presente	4 (14,3)	24 (85,7)	0,729*	4 (28,5)	10 (71,5)	0,692*
		Ausente	6 (11,1)	48 (88,9)		5 (18,5)	22	
	A49G	Presente	15 (53,6)	13 (46,4)	0,344	12 (85,7)	2 (14,3)	0,156*
		Ausente	23 (42,6)	31 (57,4)		16 (59,2)	11 (40,8)	
	CT60	Presente	21 (75)	7 (25)	0,437	13 (92,8)	1 (7,2)	1,000*
		Ausente	36 (66,6)	18 9 (33,4)		24 (88,9)	3 (11,1)	
	PTPN22	Presente	1 (3,5)	27 (96,5)	1,000*	1 (7,1)	13 (92,9)	1,000*
		Ausente	3 (5,5)	51 (94,5)		3 (11,1)	24 (88,9)	
	IFIH1	Presente	16 (57,1)	12 (42,9)	0,211	11 (78,5)	3 (21,5)	0,305*
		Ausente	23 (42,6)	31 (57,4)		16 (59,2)	11 (40,8)	

Teste qui-quadrado; * teste exato de Fisher.

Tabela 24 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com os valores de anti-TPO nos pacientes com tireoidite de Hashimoto.

		Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	11	77	0,130	10	34	0,225
	A49G	40	48	0,973	30	14	0,648
	CT60	60	28	0,957	40	4	0,742
	PTPN22	5	83	0,757	5	39	0,751
	IFIH1	41	47	0,17	28	16	0,219

Teste de Mann-Whitney

Tabela 25 - Associação dos polimorfismos estudados com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com tireoidite de Hashimoto.

	Polimorfismo (genótipo)	Sexo	Idade ao diagnóstico	Presença de bócio	Anti-TPO
CTLA4	-318 C/T	NS	NS	NS	NS
	A49G	NS	NS	NS	NS
	CT60	NS	NS	NS	NS
	PTPN22	NS	NS	NS	NS
	IFIH1	NS	NS	NS	NS

Anti-TPO: anticorpo anti-tiroperoxidase. NS: não significativo estatisticamente. Testes Mann-Whitney, qui-quadrado e exato de Fisher.

3. DM1 ASSOCIADO À TIREOIDITE DE HASHIMOTO

Observamos associação tanto do alelo quanto do genótipo não patogênico do polimorfismo A49G do *CTLA4* com o sexo feminino em pacientes com DM1 e tireoidite de Hashimoto (p=0,041 e p=0,040, respectivamente) (Tabela 26, figuras 27 e 28). A idade ao diagnóstico não esteve associada aos polimorfismos estudados (Tabela 27). O alelo e o genótipo não patogênico R620W do *PTPN22* foram associados à ausência de bócio (p=0,03 e p=0,04, respectivamente) (tabela 28). O genótipo patogênico do polimorfismo A946T do *IFIH1* foi associado a menores valores de anti-TPO (p=0,047) (tabela 29, figura 29). Não houve associação dos polimorfismos com os anticorpos anti-GAD, IA2 e IAA (tabela 30). A tabela 31 mostra um resumo dos dados clínicos e laboratoriais avaliados para cada polimorfismo estudado nos pacientes com DM1 associado a TH.

Tabela 26 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com o sexo dos pacientes com DM1+TH.

		Sexo	Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	M	4 (13,3)	26 (86,7)	0,440	3 (20)	12 (80)	0,677*
		F	3 (7,1)	39 (92,9)		3 (14,3)	18 (85,7)	
	A49G	M	18 (60)	12 (40)	**0,041**	13 (86,6)	2 (13,4)	**0,040***
		F	15 (35,7)	27 (64,3)		11 (52,4)	10 (47,6)	
	CT60	M	21 (70)	9 (30)	0,059	14 (93,3)	1 (6,7)	0,367*
		F	20 (47,6)	22 (52,4)		16 (76,2)	5 (23,8)	
	PTPN22	M	5 (16,6)	25 (83,4)	0,120*	4 (26,6)	11 (73,4)	0,138*
		F	2 (4,8)	40 (95,2)		1 (4,7)	20 (95,3)	
	IFIH1	M	17 (56,7)	13 (43,3)	0,655	12 (80)	3 (20)	0,630
		F	26 (61,9)	16 (38,1)		19 (90,4)	2 (9,6)	

M: masculino; F: feminino; Teste qui-quadrado; * teste exato de Fisher

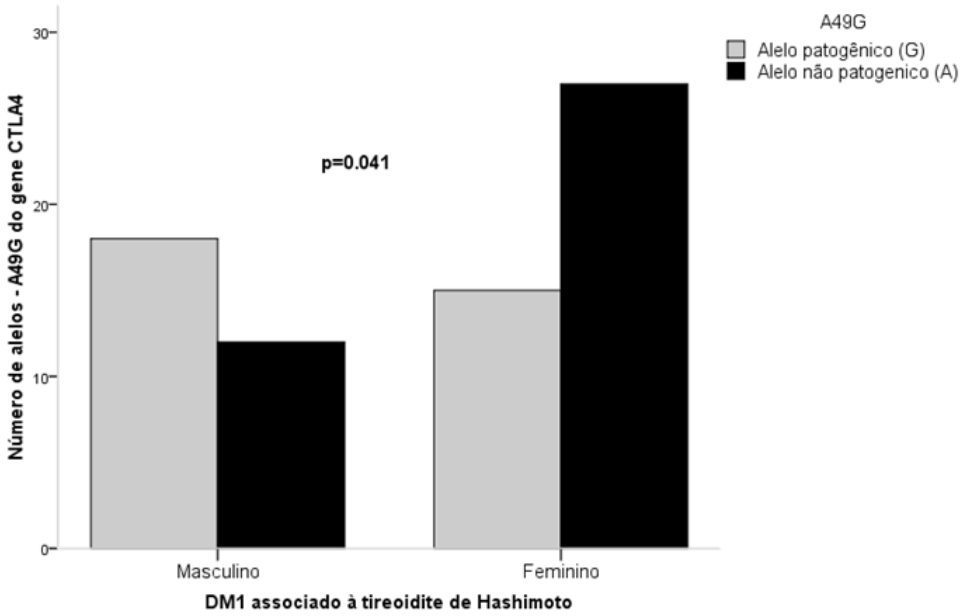

Figura 27 - Frequências de alelos patogênico (G) e não patogênico (A) do polimorfismo A49G do CTLA4 no grupo DM1 associado a tireoidite de Hashimoto (grupo 3) de acordo com o sexo (teste exato de Fisher).

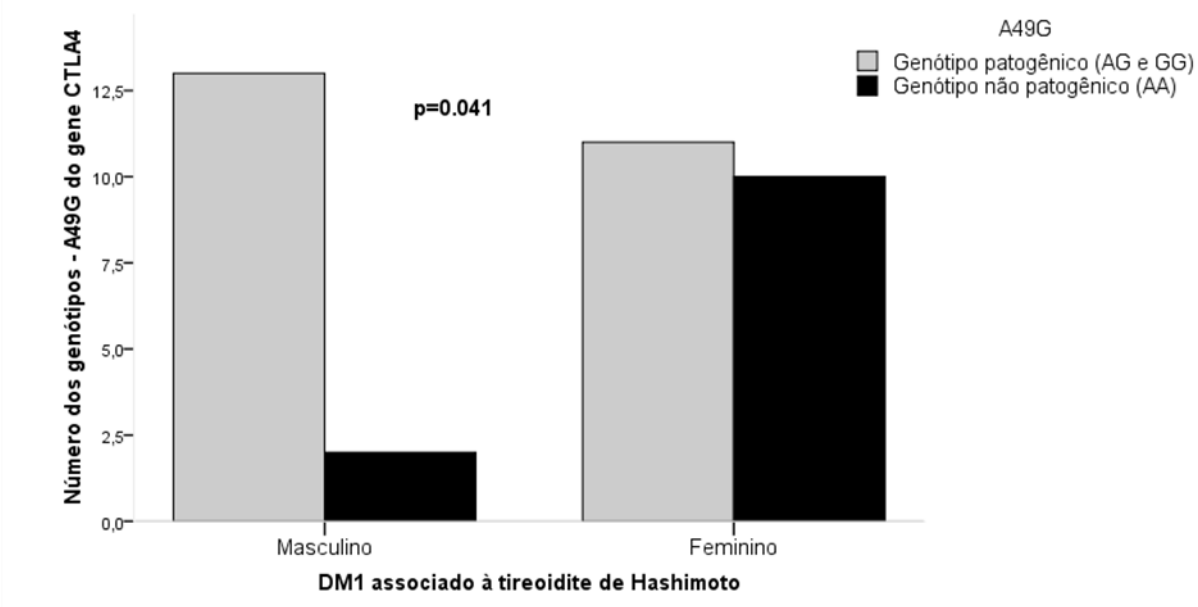

Figura 28 - Frequências dos genótipos patogênicos (AG e GG) e não patogênico (AA) do polimorfismo A49G do CTLA4 no grupo DM1 associado a tireoidite de Hashimoto (grupo 3) de acordo com sexo (teste exato de Fisher).

Tabela 27 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a idade do diagnóstico de DM1 associado a tireoidite de Hashimoto.

		Alelo patogênico	Alelo não patogênico	P	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	7	65	0,593	6	30	0,831
	A49G	33	39	0,901	24	12	0,650
	CT60	41	31	0,864	30	6	0,407
	PTPN22	7	65	0,517	5	31	0,506
	IFIH1	43	29	0,526	31	5	0,680

Teste de Mann-Whitney

Tabela 28 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a presença de bócio nos pacientes com DM1 associado a tireoidite de Hashimoto.

		Bócio	Alelo patogênico	Alelo não patogênico	P	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	Presente	2 (16,6)	10 (83,4)	0,276*	1 (16,6)	5 (83,4)	1,000
		Ausente	2 (5,9)	32 (94,1)		2 (11,7)	15 (88,3)	
	A49G	Presente	4 (33,3)	8 (66,7)	0,091	3 (50)	3 (50)	0,089
		Ausente	22 (64,7)	12 (35,3)		15 (88,2)	2 (11,8)	
	CT60	Presente	6 (50)	6 (50)	0,370	5 (83,4)	1 (16,6)	1,000
		Ausente	22 (64,7)	12 (35,3)		15 (88,3)	2 (11,7)	
	PTPN22	Presente	4 (33,3)	8 (66,7)	**0,03***	3 (50)	3 (50)	**0,04***
		Ausente	2 (5,9)	32 (94,1)		1 (5,9)	16 (94,1)	
	IFIH1	Presente	5 (41,6)	7 (58,4)	0,170	5 (83,4)	1 (16,6)	1,000
		Ausente	23 (67,6)	11 (32,3)		15 (88,2)	2 (11,8)	

*Teste exato de Fisher

Tabela 29 - Associação dos polimorfismos estudados de acordo com os valores de anti-TPO dos pacientes com DM1 associado a tireoidite de Hashimoto.

		Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	6	64	0,527	5	30	0,813
	A49G	33	37	0,357	24	11	0,568
	CT60	40	30	0,305	29	6	0,455
	PTPN22	7	63	0,107	5	30	0,478
	IFIH1	42	28	0,613	30	5	**0,047**

Teste de Mann-Whitney

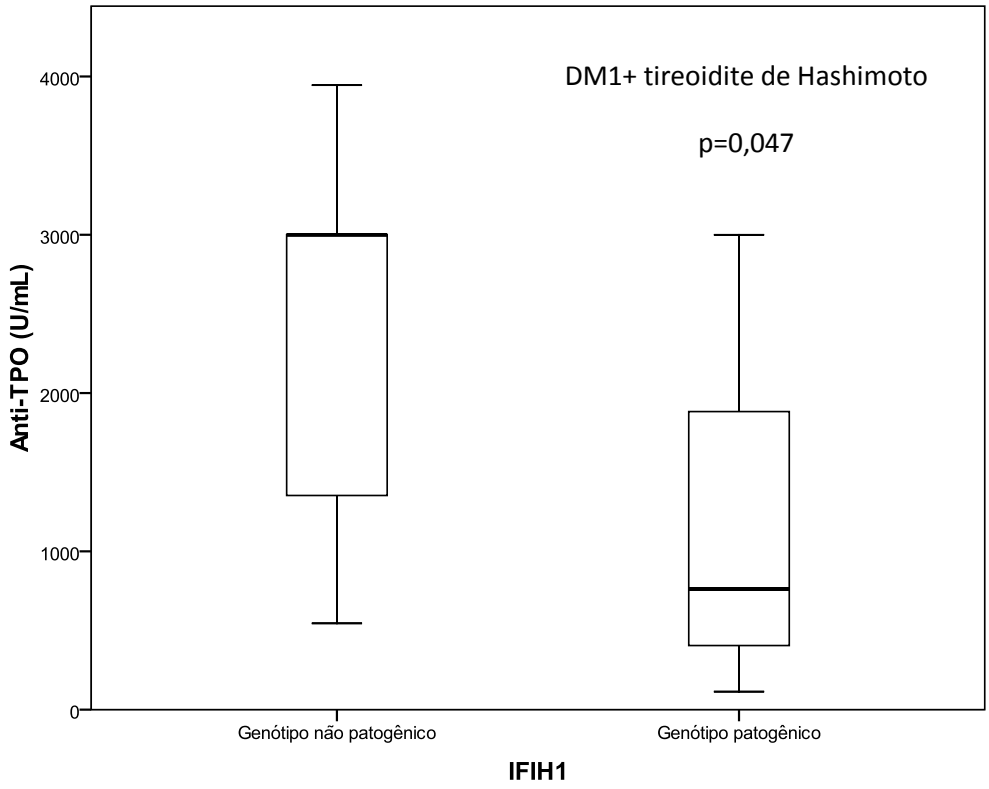

Figura 29 - Distribuição dos valores de anti-TPO dos pacientes do grupo 3 (DM1 + tireoidite de Hashimoto) de acordo com o genótipo não patogênico e patogênico do polimorfismo IFIH1.

Tabela 30 - Associação dos polimorfismos estudados de acordo com os valores de anti-GAD, IA2 e IAA dos pacientes com DM1 associado a tireoidite de Hashimoto.

		Alelo patogênico (T)	Alelo não patogênico (C)	p	Genótipo patogênico (CT e TT)	Genótipo não patogênico (CC)	p
318C/T	Anti-GAD	7	43	0,68	6	19	0,41
	IA2	6	44	0,59	5	20	0,30
	IAA	6	36	0,55	5	16	0,56
A49G	Anti-GAD	24	26	0,83	16	9	0,83
	IA2	25	25	1	17	8	0,48
	IAA	23	19	0,18	16	5	0,56
CT60	Anti-GAD	32	18	0,36	22	3	0,16
	IA2	32	18	0,90	22	3	0,80
	IAA	28	14	0,30	19	2	0,74
PTPN22	Anti-GAD	4	46	0,11	3	22	0,16
	IA2	4	46	0,67	3	22	0,80
	IAA	4	38	0,63	3	18	0,67
IFIH1	Anti-GAD	29	21	0,79	21	4	0,61
	IA2	29	21	0,72	21	4	0,65
	IAA	24	18	0,83	18	3	0,67

Tabela 31 - Associação dos polimorfismos estudados e os dados clínicos e laboratoriais nos pacientes com DM1 associado à tireoidite de Hashimoto.

	Polimorfismo (genótipo)	Sexo	Idade ao diagnóstico	Presença de bócio	Anti-TPO
CTLA4	-318 C/T	NS	NS	NS	NS
	A49G	**0,04**	NS	NS	NS
	CT60	NS	NS	NS	NS
	PTPN22	NS	NS	**0,03**	NS
	IFIH1	NS	NS	NS	**0,047**

Anti-TPO: anticorpo anti-tiroperoxidase. NS: não significativo estatisticamente. Testes Mann-Whitney, qui-quadrado e exato de Fisher.

4. TIREOIDITE DE HASHIMOTO AGRUPADO

Ao agruparmos os grupos 2 e 3 e analisarmos os polimorfismos estudados, o alelo não patogênico e o genótipo não patogênico do polimorfismo *PTPN22* estiveram associados ao sexo feminino (p=0,020 e p=0,023, respectivamente) (Tabela 32 e figuras 30 e 31). A idade ao diagnóstico e a presença de bócio não apresentaram associação com os polimorfismos estudados em todos os pacientes com tireoidite de Hashimoto (Tabelas 33 e 34). O genótipo patogênico do polimorfismo *IFIH1* esteve associado a valores menores de anti-TPO (Tabela 35 e figura 32). A tabela 36 mostra um resumo dos dados clínicos e laboratoriais avaliados para cada polimorfismo estudado nos pacientes com tireoidite de Hashimoto agrupado.

Tabela 32 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com o sexo dos pacientes com tireoidite de Hashimoto (grupos 2+3).

		Sexo	Alelo patogênico	Alelo não patogênico	p	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	M	7 (15,9)	37 (84,1)	0,251	6 (27,2)	16 (72,8)	0,317
		F	11 (9,5)	105 (90,5)		10 (17,3)	48 (82,7)	
	A49G	M	21 (47,7)	23 (52,3)	0,742	16 (72,8)	6 (27,2)	0,539
		F	52 (44,8)	64 (55,2)		38 (65,5)	20 (34,5)	
	CT60	M	30 (68,2)	14 (31,8)	0,414	20 (90,9)	2 (9,1)	0,719*
		F	71 (61,2)	45 (38,8)		50 (86,2)	8 (13,8)	
	PTPN22	M	7 (15,9)	37 (84,1)	**0,020***	6 (27,2)	16 (72,8)	**0,023***
		F	5 (4,4)	111 (95,6)		4 (6,9)	54 (93,1)	
	IFIH1	M	23 (52,3)	21 (47,7)	0,972	16 (72,8)	6 (27,2)	0,898
		F	61 (52,6)	55 (47,4)		43 (74,1)	15 (25,9)	

M: masculino; F: feminino; Teste qui-quadrado; * teste exato de Fisher

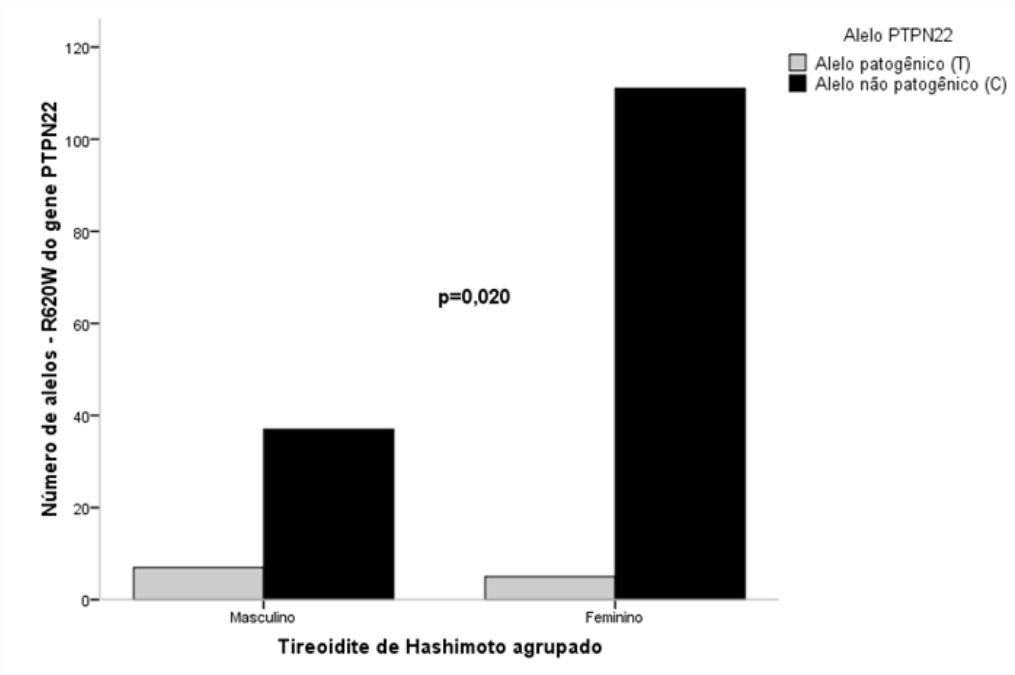

Figura 30 - Frequências dos alelos patogênico (T) e não patogênico (C) do polimorfismo R629W o PTPN22 no grupo tireoidite de Hashimoto agrupado de acordo com sexo (teste exato de Fisher).

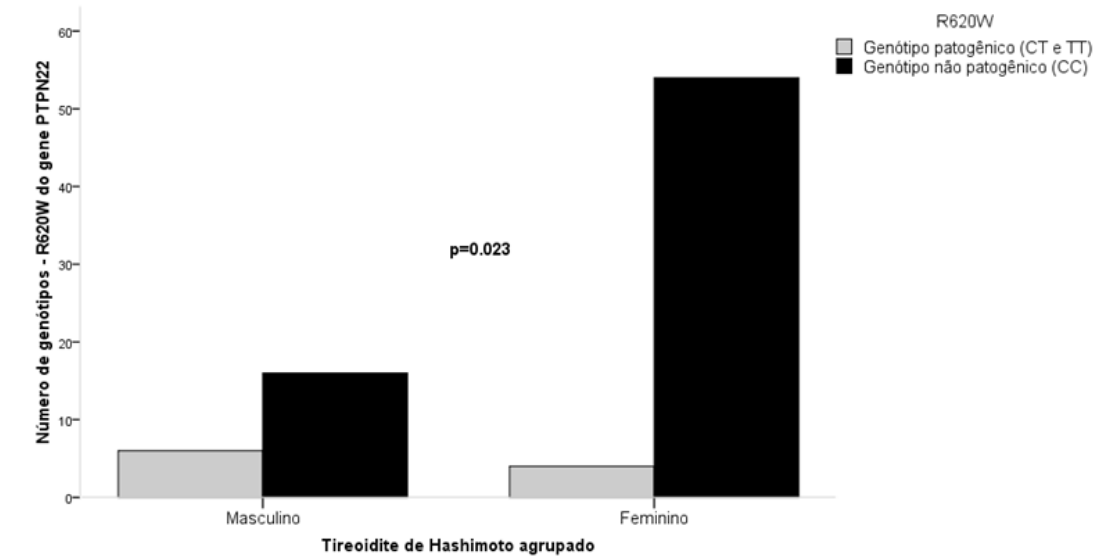

Figura 31 - Frequências dos genótipos patogênicos (CT e TT) e não patogênico (CC) do polimorfismo R629W do PTPN22 no grupo de pacientes tireoidite de Hashimoto agrupado de acordo com sexo (teste exato de Fisher).

Tabela 33 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a idade do diagnóstico de tireoidite de Hashimoto agrupado (grupos 2+3).

		Alelo patogênico	Alelo não patogênico	P	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	18	142	0,728	16	64	0,904
	A49G	73	87	0,487	54	26	0,906
	CT60	101	59	0,084	70	10	0,122
	PTPN22	12	148	0,503	10	70	0,422
	IFIH1	84	76	0,104	59	21	0,475

Teste de Mann-Whitney

Tabela 34 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com a presença de bócio nos pacientes com tireoidite de Hashimoto (grupos 2 e 3).

		Bócio	Alelo patogênico	Alelo não patogênico	P	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	Presente	6 (15)	34 (85)	0,321	5 (25)	15 (75)	0,492
		Ausente	8 (9,1)	80 (90,9)		7 (15,9)	37 (84,1)	
	A49G	Presente	19 (47,5)	21 (52,5)	0,703	15 (75)	5 (25)	0,773*
		Ausente	45 (51,1)	43 (48,9)		31 (70,4)	13 (29,6)	
	CT60	Presente	27 (67,5)	13 (32,5)	0,860	18 (90)	2 (10)	1,000*
		Ausente	58 (65,9)	30 (34,1)		39 (88,6)	5 (11,4)	
	PTPN22	Presente	5 (12,5)	35 (87,5)	0,284	4 (20)	16 (80)	0,244
		Ausente	5 (5,7)	83 (94,3)		4 (9,1)	40 (90,9)	
	IFIH1	Presente	21 (52,5)	19 (47,5)	0,981	16 (80)	4 (20)	0,547*
		Ausente	46 (52,3)	42 (47,7)		31 (70,4)	13 (29,6)	

Teste qui-quadrado; * teste exato de Fisher.

Tabela 35 - Frequência dos polimorfismos estudados de acordo com os valores de anti-TPO dos pacientes com diagnóstico de tireoidite de Hashimoto (grupos 2 e 3).

		Alelo patogênico	Alelo não patogênico	P	Genótipo patogênico	Genótipo não patogênico	p
CTLA4	-318 C/T	17	141	0,403	15	64	0,403
	A49G	73	85	0,530	54	25	0,996
	CT60	100	58	0,468	69	10	0,755
	PTPN22	12	146	0,154	10	69	0,467
	IFIH1	83	75	0,174	58	21	**0,042**

Teste de Mann-Whitney

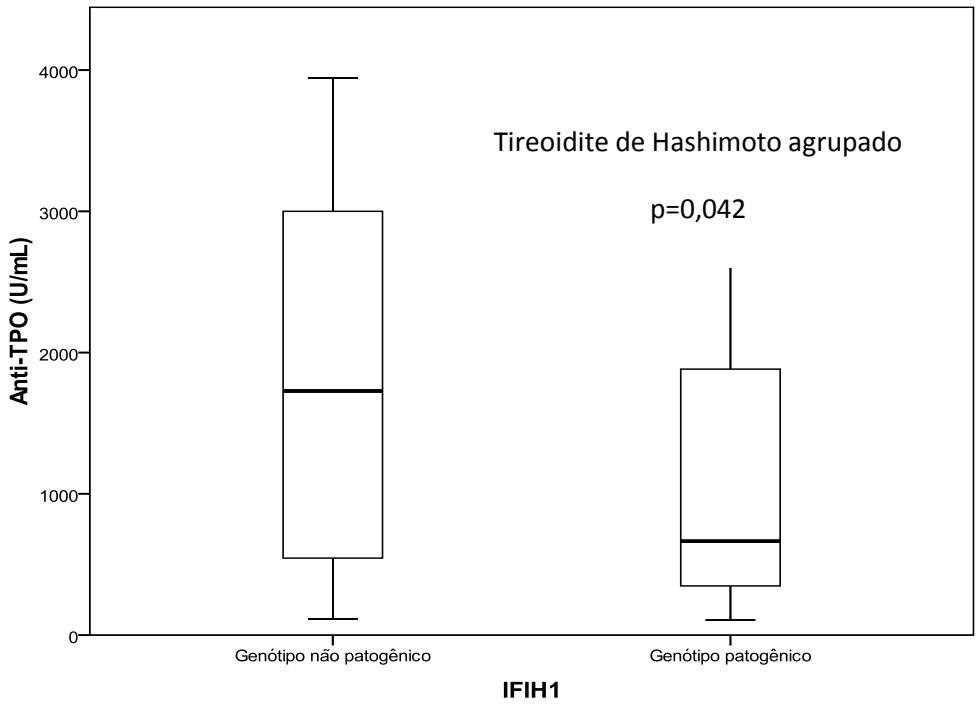

Figura 32 - Distribuição dos valores de anti-TPO dos pacientes com tireoidite de Hashimoto agrupado (grupos 2+3) de acordo com o genótipo não patogênico e patogênico do polimorfismo IFIH1.

Tabela 36 - Associação dos polimorfismos estudados com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com tireoidite de Hashimoto agrupado (grupos 2 +3).

	Polimorfismo (genótipo)	Sexo	Idade ao diagnóstico	Presença de bócio	Anti-TPO
CTLA4	-318 C/T	NS	NS	NS	NS
	A49G	NS	NS	NS	NS
	CT60	NS	NS	NS	NS
	PTPN22	**0,023**	NS	NS	NS
	IFIH1	NS	NS	NS	**0,042**

Anti-TPO: anticorpo anti-tiroperoxidase. NS: não significativo estatisticamente. Testes Mann-Whitney, qui-quadrado e exato de Fisher.

DISCUSSÃO

A doença autoimune da tireoide envolve principalmente a tireoidite crônica linfocítica ou tireoidite de Hashimoto e a doença de Graves. Como são doenças geneticamente complexas, diversos genes de suscetibilidade são postulados como participantes no envolvimento da tireoide. Como pode existir uma sobreposição clínica entre as doenças da tireoide, alguns genes estudados são comuns e caracteristicamente todas as doenças autoimunes apresentam infiltrado linfocítico. Este estudo propôs estudar os polimorfismos genéticos mais conhecidos (*CTLA4* e *PTPN22*) e um recentemente relatado (*IFIH1*), porém em pacientes pediátricos, faixa etária menos frequentemente acometida pela DAIT.

1. DADOS CLÍNICOS

A média de idade do diagnóstico de DAIT foi semelhante entre os grupos 1 e 2, e maior no grupo 3 (tabela 5).

Como nos adultos, observamos predomínio do sexo feminino em todos os grupos. Nossa casuística observou predomínio da raça branca, através de identificação do próprio paciente ou familiar (tabela 5).

Em nossa casuística, os pacientes com doença de Graves (grupo 1) apresentaram longo tratamento com DAT até o tratamento definitivo com radioiodo (44 ± 25 meses). O tratamento inicial com DAT em crianças deve ser proposto por 1 a 2 anos [77]. O tratamento definitivo com radioiodo deve ser realizado com cautela em crianças menores que 5 anos de idade e em crianças entre 5 e 10 anos, a dose aceitável de radioiodo é de 10 mCi [77; 78]. Avaliamos 4 pacientes menores que 5 anos de idade, sendo que apenas dois receberam tratamento com radioiodo após 96 e 44 meses de tratamento medicamentoso, atingindo idade de 12 e 7 anos no momento do tratamento definitivo. Vinte e oito pacientes estavam entre 5 e 10 anos ao diagnóstico e apenas 9 receberam radioiodoterapia. Como os pacientes eram provenientes de diferentes serviços, não havia uma padronização quanto à indicação da dose e tempo do tratamento definitivo com radioiodo. Nenhum paciente com doença de Graves

foi submetido à tireoidectomia como opção de tratamento definitivo. Provavelmente devido a maior facilidade em administrar radioiodo, os bócios não eram volumosos e mesmo devido à carência de cirurgiões experientes para esta abordagem.

A presença de outra doença autoimune associada à doença de Graves foi baixa (6%), pois não houve uma pesquisa sistemática de outras doenças autoimunes, mas apenas a coleta de informações em prontuários e através de familiares.

A oftalmopatia de Graves foi diagnosticada pelo exame físico e foi observada em 62% dos pacientes, apresentando-se com uma porcentagem maior que a encontrada na literatura que descreve até 33% dos pacientes com menos de 18 anos apresentando oftalmopatia [79].

Metade dos pacientes do grupo com tireoidite de Hashimoto (grupo 2) apresentaram hipotireoidismo evidente (TSH>10 mUI/L), sendo observado apenas 27,7% no grupo de DM1 associado à TH. A avaliação da função e da autoimunidade tireoidiana deve ser realizada em todos os pacientes com DM1, devido a uma maior prevalência de TH nestes pacientes [80]. A presença de outras doenças autoimunes foi mais observada em pacientes com TH, entretanto nenhum caso de insuficiência adrenal autoimune foi encontrado, afastando a possibilidade de se tratar de doença poliglandular autoimune tipo II [14]. O envolvimento de familiares com DAIT também foi maior no grupo 2, por se tratar de uma doença prevalente na população adulta, próximo de 2% na população adulta feminina e 0,2% na masculina [13].

2. POLIMORFISMOS

2.1. CTLA4

A análise do polimorfismo -318C>T do gene *CTLA4* não mostrou diferença estatística entre os grupos 1, 2 e 3 e o grupo controle (tabela 6). Entretanto, estudo brasileiro realizado por Santos et al. encontrou associação do genótipo CT e do alelo T patogênico com a oftalmopatia de Graves

principalmente em pacientes do sexo masculino, mas foi realizado em pacientes adultos com DG [45]. Estudo na Turquia, em crianças com TH, encontrou a frequência do genótipo CT mais alta quando comparada ao grupo controle (16,4% versus 8,9%, p=0,32), porém sem significância estatística [46], semelhante à nossa casuística (22,7% versus 12,3%, p=0,131).

Todos os dados clínicos e laboratoriais dos grupos 1, 2 e 3 não foram associados ao polimorfismo -318C>T, tanto ao alelo patogênico T quanto ao genótipo patogênico, mesmo considerando as doenças agrupadas (DAIT e TH agrupada). Apesar da substituição da citosina por timina na posição -318 diminuir a atividade promotora e a expressão do gene *CTLA4*, este polimorfismo não apresentou associação com DAIT em nossa casuística [39; 40; 81].

A frequência do alelo patogênico (G) do polimorfismo A49G do gene *CTLA4* foi estatisticamente maior em todos os grupos, exceto no grupo 2 (doença de Graves). É descrito uma frequencia maior do alelo e do genótipo patogênico em pacientes com DG e poderia também estar relacionado à gravidade e persistência da doença [44; 82]. Entretanto, não encontramos associação deste polimorfismo com presença de exoftalmopatia ou valores de TRab (tabelas 16 e 18) [82; 83; 84]. Em estudo brasileiro de crianças com doença de Graves, a frequência do polimorfismo A49G não foi diferente entre crianças avaliadas e controle (36% vs 30%, respectivamente) e os autores também não encontraram relação com os parâmetros clínicos e laboratoriais de pior prognóstico na DG [48]. Quando analisamos o genótipo patogênico (AG e GG), a frequência nos pacientes com DG foi significativamente maior (p=0,049), sendo também maior quando agrupamos todas as DAIT (p=0,024) (tabela 7), não ocorrendo nos demais grupos isoladamente. Entretanto, os parâmetros clínicos e laboratoriais analisados para DG, continuam a não apresentarem associação com este polimorfismo. Apenas a frequência de tratamento com radioiodo foi maior nos pacientes com o alelo ou o genótipo não patogênico do polimorfismo A49G (tabela 19, figuras 23 e 24), mostrando a princípio não ser um fator agravante da doença. Nos demais grupos estudados, encontramos apenas associação do alelo e do genótipo patogênico com o sexo masculino nos

pacientes do grupo 3 (tabela 26). Em estudos realizados em pacientes diabéticos tipo 1, sem tireoidite de Hashimoto associada, não observou-se associação com este polimorfismo [50; 51]. Ikegami et al. analisaram 1.114 pacientes, 769 com diabetes e 345 com doença tireoidiana autoimune associada e evidenciaram que o polimorfismo A49G esteve associado a DM1 complicado com a DAIT, sugerindo a importância de classificarmos o DM1 de acordo com a presença ou ausência de DAIT associada [53].

O alelo patogênico (G) do polimorfismo CT60 do gene *CTLA4* foi mais frequente apenas no grupo com DG (p=0,035) (tabela 8), confirmando a alta frequência deste alelo em diversas populações de pacientes com DG, chegando a 60% a frequência do alelo patogênico [42; 52; 85]. Em pacientes com TH também foi descrita maior frequência, mas com risco menor de desenvolvimento da doença. Em nosso estudo, não identificamos associação nos demais grupos. Petrone et al. observaram associação do alelo G em pacientes com DG e exoftalmopatia quando comparados aos controles, mas não houve diferença entre os pacientes com e sem exoftalmopatia de Graves [86]. Observamos uma associação do alelo patogênico com menor tempo de duração do tratamento medicamentoso (p=0,004, figura 26), podendo indicar maior gravidade da tireotoxicose ou maior falha no tratamento, levando o clínico a indicar o tratamento definitivo mais rapidamente. Para elucidação, seria necessário padronizarmos a droga usada e um tempo fixo de seguimento para melhor interpretação da importância deste polimorfismo. Portanto, até o momento, a presença do alelo patogênico sugere apenas a presença da DG, mas não parece ter relação com parâmetros clínicos de gravidade da DG (como valores de TRab, idade mais precoce, exoftalmopatia) ou com outras DAIT. Ao compararmos o alelo e o genótipo patogênico do CT60 entre DG e os demais grupos, não encontramos diferença nas frequências (tabela 11).

2.2. PTPN22

O presente estudo não demonstrou associação do polimorfismo R620W do gene *PTPN22* com pacientes com doença de Graves e os parâmetros

clínicos e laboratoriais da doença (tabelas 14 a 20). Skórka et al. encontraram associação com a idade de início da DG mais precoce (mediana de 20,8 anos), mas sua casuística inclui pacientes de 6 até 78 anos, com mediana de 42,5 anos [62]. Chabchoub et al. estudaram pacientes com doença de Graves e tireoidite de Hashimoto e não demonstraram associação, tanto separadamente como agrupados em DAIT [63]. Entretanto, quando agrupamos todos os nossos pacientes (DAIT), encontramos associação deste polimorfismo, mas apenas na presença do alelo patogênico e não do genótipo patogênico (p=0,047, tabela 9). Ichimura et al. não identificaram o alelo patogênico do polimorfismo R620W do PTPN22 em sua população japonesa de pacientes com DG e também no grupo controle [63; 64]. Em nossa casuística, a frequência do alelo patogênico foi baixa em todos os grupos estudados e no controle (tabela 9), sendo significativa nos pacientes com DM1 associado a TH (grupo 3; p=0,043). Dultz et al. também encontraram uma frequência maior do alelo patogênico (T) em pacientes com o DM1 associado à tireoidite de Hashimoto (23,6%) quando comparada aos pacientes com diagnóstico de DAIT isolada (8,6%), somente DM1 (10,7%) e aos controles (8%) [59]. Os autores indicam que o alelo patogênico T deste polimorfismo seria um fator de risco importante para o desenvolvimento de DAIT e DM1 em um mesmo paciente e juntamente com os achados clínicos e laboratoriais poderia ser um parâmetro a mais a oferecer risco de desenvolvimento das doenças autoimunes. Em nossa casuística, observamos associação do polimorfismo apenas com a ausência de bócio no grupo 3, relacionando tanto o alelo quanto o genótipo não patogênico (p=0,03 e p=0,04, respectivamente, tabela 28), não demosntrando ser um fator a mais de risco na associação de DM1 e DAIT [14].

2.3. IFIH1

No presente estudo, encontramos associação entre o polimorfismo A946T do gene *IFIH1* e o grupo de pacientes com DM1 e TH (grupo 3), tanto o alelo patogênico (T) quanto o genótipo patogênico (CT e TT) (Tabela 10, p=0,009 e p=0,007, respectivamente). Ao compararmos com os grupos 1 e 2, os genótipos do polimorfismo também estiveram associados ao grupo 3 (DM1

associado à TH), reforçando a diferença deste subgrupo de DAIT (Tabela 11, p=0,031 e 0,023, respectivamente). Não só este polimorfismo rs1990760, mas outros do *IFIH1* parecem estar associados a maior susceptibilidade de desenvolvimento de DM1 [70; 71]. Sutherland et al. determinaram em 602 pacientes com DG uma associação moderada, mas significativa [OR 1,47 (IC 1,23–1,76); $p=1,9 \times 10^{-5}$] com este polimorfismo [74]. Entretanto, Penna-Martinez et al. não obtiveram os mesmos resultados para DG e para TH [75]. Nenhum destes estudos avaliou isoladamente pacientes menores de 21 anos. O genótipo patogênico esteve associado com menores valores de anti-TPO no grupo 3 (p=0,042, tabela 29 e figura 29), podendo indicar maior destruição da glândula tireoidiana, levando a atrofia e consequentemente menor exposição de antígenos; ou os valores menores de anti-TPO no grupo 3 poderiam indicar um diagnóstico mais precoce, pelo conhecimento de desenvolvimento de DAIT em pacientes com DM1. Ressaltamos que a concentração de anti-TPO é extremamente variável e não está associada à hipofunção da glândula.

CONCLUSÕES

- Determinamos as frequências alélicas e genótipos dos polimorfismos -318C/T, A49G e CT60 do *CTLA4*, R620W do PTPN22 e A946T do IFIH1 em crianças e adolescentes com doença de Graves, tireoidite de Hashimoto e diabetes mellitus tipo 1 associado a tireoidite de Hashimoto através de genotipagem em tempo real.

- Determinamos as frequências dos polimorfismos e observamos diferença do polimorfismo A946T do *IFIH1* entre os grupos com doença de Graves e tireoidite de Hashimoto em comparação ao grupo DM1 associado a tireoidite de Hashimoto (p=0,031 e p=0,023, respectivamente).

- Estabelecemos associação dos polimorfismos com os dados clínicos e laboratoriais em todos os grupos.

ANEXOS

Anexo 1 - QUESTIONÁRIO Data __/__/__

DOENÇA AUTOIMUNE DA TIREOIDE

Nome_____

RG _____ Telefone (___)_____

DNA número: ____

Data de nascimento __/___/___ Sexo [ ] feminino [ ] masculino

Cor [ ] branca [ ] negra [ ] amarela [ ] parda

Idade cronológica: _____ Data: ___/____/____

Estat: ____ DP: _____

Peso: ____ DP: _____

IMC: _____ DP: _____

Antecedentes pessoais:

Doenças autoimunes associadas:

[ ] Vitiligo – idade diagnóstico _____

[ ] Artrite Reumatóide – idade diagnóstico _____

[ ] LES – idade diagnóstico _____

[ ] Outras:_____

[ ] Tabagismo

Antecedentes familiares:

[ ] Hipertireoidismo: grau de parentesco: _____

[ ] Hipotireoidismo: grau de parentesco: _____

[ ] Outras doenças autoimunes: grau de parentesco: _____

Coleta de DNA do Familiar: _____

TIREOIDE

Idade ao diagnóstico da tireoidopatia: _____

TSH ao diagnóstico: Anti TG :

T4l ao diagnóstico: Anti TPO:

Tratamento atual: _____

Tratamento da doença de Graves:

[ ] Radioiodoterapia Dose: ___mCi Data __/__/__ [ ] Cirurgia Data __/__/__

Tempo total de uso de DAT: _____

DIABETES TIPO 1

Idade diagnóstico_____ Data: ____/_____/____

Anticorpos: Anti GAD: _____ Peptídeo C:_____

Anti IA2: _____

IAA: _____

Exame Físico:

[ ] EXOFTALMIA [ ] sim [ ] não

[ ] BÓCIO Volume total _____ PA _____

Complicação do DM [ ]não [ ]sim: qual: _____

Exames laboratoriais:

Data								
IC (anos)								
T3								
T4								
T4L								
TSH								
Anti-TG								
Anti-TPO								
Trab								
USG								
Tratamento								

Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M □ F □
DATA NASCIMENTO:...../...../.....
ENDEREÇO.....Nº.....APTO:.....
BAIRRO:..... .CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....
2.RESPONSÁVEL LEGAL :.....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO:.....Nº..... APTO: .....
BAIRRO:.....CIDADE: .....
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS GENE CTLA-4, PTPN22 E IFIH1 EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA DE GRAVES, TIREOIDITE DE HASHIMOTO E DM1 ASSOCIADO A TIREOIDITE DE HASHIMOTO".

2. PESQUISADOR: SUEMI MARUI

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 70248

UNIDADE DO HCFMUSP: INSTITUTO DA CRIANÇA – HC - FMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	□X	RISCO MÉDIO	□
RISCO BAIXO	□	RISCO MAIOR	□

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS

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

1 – Desenho do estudo e objetivo(s): essas informações serão fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa ao estudo genético para melhor esclarecimento da doença de seu filho(a) (Doença de Graves ou Tireoidite de Hashimoto), relacionada ao problema de tireoide dele (a);

2 – Para o início deste trabalho colheremos 5 ml de sangue do antebraço, para 2 tubos de coleta de material (total de 10ml de sangue);

3 – O risco da coleta se resume à possibilidade de hematoma (“roxo”) ou dor no local da coleta, como em qualquer outra coleta de sangue já realizada por seu filho (a). Esta será a única coleta extra de material, as demais coletas serão para o acompanhamento rotineiro da doença, que continuará independente de sua decisão de participar ou não deste trabalho;

4 – Só poderemos concluir o resultado da pesquisa quando o estudo estiver terminado e pudermos comparar os resultados de todos os pacientes que se submeteram ao exame; antes disso não teremos como esclarecer qualquer resultado;
5 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas;

O principal investigador da pesquisa é Dra Suemi Marui que pode ser encontrado no Instituto da Criança, Telefone 3069-8537. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;

6 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

7 - Ao voluntário é concedido o direito de confidencialidade; as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos mesmos;
8 – Ao voluntário é concedido o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
9 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;

10 - O pesquisador e o executante assumem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisa;

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto: “ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS GENE CTLA-4*, PTPN22 E IFIH1* EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA DE GRAVES, TIREOIDITE DE HASHIMOTO E DM1 ASSOCIADO A TIREOIDITE DE HASHIMOTO”.

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

Assinatura do paciente / representante legal; Data / /

Assinatura da testemunha; Data / /

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

(Para o responsável do projeto) - Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Dra Suemi Marui – CRM 70248; Data / /

Anexo 3 – Aprovação pela CAPPesq

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

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 20/05/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1101/08**, intitulado: "**ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE CTLA-4 EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA DE GRAVES E TIREOIDITE DE HASHIMOTO**" apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA**, 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: **Dr Durva Damiani**
Pesquisador (a) Executante: **Márcia Regina Bedin**

CAPPesq, 21 de Maio de 2009

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

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo 4 – Aprovação pela CAPPesq para troca de título

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

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 07.04.10, **APROVOU** **as modificações abaixo mencionadas** referente Protocolo de Pesquisa nº **1101/08**, intitulado: "**ESTUDO DO POLIMORFISMO DO GENE CTLA-4 EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DOENÇA DE GRAVES E TIREOIDITE DE HASHIMOTO** ", apresentado pelo Departamento de **PEDIATRIA.**

- **Mudança de título para –** "*Estudo de polimorfismos dos gene CTLA-4, PTPN22 e IFIH1 em crianças e adolescentes com Doença de Graves, Tireoidite de Hashimoto e DM1 associado a Tireoidite de Hashimoto*"
- Inclusão do estudo de 2 genes relacionados às patologias da tireóide propostas (Doença de Graves e Tireoidite de Hashimoto): PTPN22 e IFIH1 (A946T)
- Inclusão de um grupo de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 associado a tireoidite de Hashimoto, devido a associação dos polimorfismos citados a essas patologias
- Novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisador (a) Responsável: **DR. DURVAL DAMIANI**

Pesquisador (a) Executante: **DRA. MARCIA REGINA BEDIN**

CAPPesq, 07 de abril de 2010

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 da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

matc

BIBLIOGRAFIA

1 DE SOUZA, A. W. et al. Immune system: part III. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity. **Rev Bras Reumatol,** v. 50, n. 6, p. 665-79, Dec 2010. ISSN 1809-4570. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21243307 >.

2 K, A. A.; H, L. A. **Cellular and Molecular Immunology**. 6. 2008. 563

3 CRUVINEL, W. E. M. et al. Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev Bras Reumatol,** v. 50, n. 4, p. 434-61, Aug 2010. ISSN 1809-4570. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21125178 >.

4 WANG, C.; CRAPO, L. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. **Endocrinol Metab Clin North Am,** v. 26, n. 1, p. 189-218, Mar 1997. ISSN 0889-8529. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9074859 >.

5 BRENT, G. Clinical practice. Graves' disease. **N Engl J Med,** v. 358, n. 24, p. 2594-605, Jun 2008. ISSN 1533-4406. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18550875 >.

6 MONTE, O.; NILZA, S.; AL, E. Classificação e Fisiopatologia das Tireotoxicoses. In: CARVALHO, M. (Ed.). **Tratado de Tireóide e Paratireóide**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2007. cap. 10, p.123-129.

7 ZIMMERMAN, D.; LTEIF, A. Thyrotoxicosis in children. **Endocrinol Metab Clin North Am,** v. 27, n. 1, p. 109-26, Mar 1998. ISSN 0889-8529. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9534032 >.

8 MCIVER, B.; MORRIS, J. The pathogenesis of Graves' disease. **Endocrinol Metab Clin North Am,** v. 27, n. 1, p. 73-89, Mar 1998. ISSN 0889-8529. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9534029 >.

[9] MONTE, O.; SCALISSE, N. Hipertireoidismo. In: MONTE, O.;LONGUI, C.*, et al* (Ed.). **Endocrinologia para o Pediatra**. São Paulo: Atheneu, 2006. cap. 11, p.133-138.

[10] FURLANETTO, R. Hipertireoidismo. In: SAAD, M. J. A.;MACIEL, R. M. B.*, et al* (Ed.). **Endocrinologia**. São Paulo: Atheneu, 2007. cap. 19, p.365-376.

[11] SAAB, A.; TOBGI, S. Hipotireoidismo. In: MONTE, O.;LONGUI, C.*, et al* (Ed.). **Endocrinologia para o pediatra**. 3. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. cap. 9, p.117-126.

[12] BALOCH, Z.; LIVOLSI, V. Part III - Introduction to Thyroid diseases - Pathology. In: BRAVERMAN, L. e UTIGER, R. (Ed.). **Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental & Clinical Text**. 9. Raven, 2004. cap. 21, p.422-444.

[13] KNOBEL, M.; MEDEIROS-NETO, G. Hipotireoidismo. In: SAAD, M.;MACIEL, R.*, et al* (Ed.). **Endocrinologia**. 1. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. cap. 20, p.377-411.

[14] DIB, S.; VELLOSO, L. Síndromes Auto-imune-poliendócrinas. In: SAAD, M.;MACIEL, R.*, et al* (Ed.). **Endocrinologia**. São Paulo: Atheneu, 2007. cap. 56, p.1169-1178.

[15] WIEBOLT, J. et al. Clustering of additional autoimmunity behaves differently in Hashimoto's patients compared with Graves' patients. **Eur J Endocrinol,** v. 164, n. 5, p. 789-94, May 2011. ISSN 1479-683X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21378091 >.

[16] PEARCE, S.; KENDALL-TAYLOR, P. Part III - Introduction to Thyroid diseases - Genetic Factors in Thyroid Disease. In: BRAVERMAN, L. e UTIGER, R. (Ed.). **Werner & Ingbar's The Thyroid: A Fundamental & Clinical Text**. 9. Raven, 2009. cap. 20, p.407-421.

[17] UMPIERREZ, G. E. et al. Thyroid dysfunction in patients with type 1 diabetes: a longitudinal study. **Diabetes Care,** v. 26, n. 4, p. 1181-5, Apr 2003. ISSN 0149-5992. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663594 >.

[18] MANTOVANI, R.; MANTOVANI, L.; DIAS, V. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: prevalence and risk factors. **J Pediatr Endocrinol Metab,** v. 20, n. 6, p. 669-75, Jun

2007. ISSN 0334-018X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17663291 >.

19 SILVA, M.; MORY, D.; DAVINI, E. [Genetic and humoral autoimmunity markers of type 1 diabetes: from theory to practice]. **Arq Bras Endocrinol Metabol,** v. 52, n. 2, p. 166-80, Mar 2008. ISSN 1677-9487. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18438527 >.

20 EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: molecular, cellular and clinical immunology. **Adv Exp Med Biol,** v. 552, p. 306-10, 2004. ISSN 0065-2598. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15622970 >.

21 BRIX, T. H. et al. Evidence for a major role of heredity in Graves' disease: a population-based study of two Danish twin cohorts. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 86, n. 2, p. 930-4, Feb 2001. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158069 >.

22 YANAGAWA, T. et al. Human histocompatibility leukocyte antigen-DQA1*0501 allele associated with genetic susceptibility to Graves' disease in a Caucasian population. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 76, n. 6, p. 1569-74, Jun 1993. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8501164 >.

23 KELLY, M. A. et al. Molecular aspects of type 1 diabetes. **Mol Pathol,** v. 56, n. 1, p. 1-10, Feb 2003. ISSN 1366-8714. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560454 >.

24 MACIEL, L. M. et al. Association of the HLA-DRB1*0301 and HLA-DQA1*0501 alleles with Graves' disease in a population representing the gene contribution from several ethnic backgrounds. **Thyroid,** v. 11, n. 1, p. 31-5, Jan 2001. ISSN 1050-7256. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11272094 >.

25 ATKINSON, M.; EISENBARTH, G. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet,** v. 358, n. 9277, p. 221-9, Jul 2001. ISSN 0140-6736. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11476858 >.

[26] DAVIES, J. et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. **Nature,** v. 371, n. 6493, p. 130-6, Sep 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8072542 >.

[27] COX, N. et al. Seven regions of the genome show evidence of linkage to type 1 diabetes in a consensus analysis of 767 multiplex families. **Am J Hum Genet,** v. 69, n. 4, p. 820-30, Oct 2001. ISSN 0002-9297. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11507694 >.

[28] REVEILLE, J. D. The genetic basis of autoantibody production. **Autoimmun Rev,** v. 5, n. 6, p. 389-98, Jul 2006. ISSN 1568-9972. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890892 >.

[29] MELO, M. Diabetes *Mellitus* Tipo 1. In: MONTE, O.;LONGUI, C. A.*, et al* (Ed.). **Endocrinologia para o Pediatra**. Terceira. São Paulo: Atheneu, 2006. cap. 78, p.883-886.

[30] HARPER, K. et al. CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. **J Immunol,** v. 147, n. 3, p. 1037-44, Aug 1991. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1713603 >.

[31] OKAZAKI, T.; IWAI, Y.; HONJO, T. New regulatory co-receptors: inducible co-stimulator and PD-1. **Curr Opin Immunol,** v. 14, n. 6, p. 779-82, Dec 2002. ISSN 0952-7915. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12413529 >.

[32] WATANABE, N. et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. **Nat Immunol,** v. 4, n. 7, p. 670-9, Jul 2003. ISSN 1529-2908. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796776 >.

[33] LEE, K. et al. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. **Science,** v. 282, n. 5397, p. 2263-6, Dec 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9856951 >.

[34] CARRENO, B. et al. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. **J**

Immunol, v. 165, n. 3, p. 1352-6, Aug 2000. ISSN 0022-1767. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10903737 >.

35 PEREZ, V. et al. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. **Immunity,** v. 6, n. 4, p. 411-7, Apr 1997. ISSN 1074-7613. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9133420 >.

36 OOSTERWEGEL, M. et al. CTLA-4 and T cell activation. **Curr Opin Immunol,** v. 11, n. 3, p. 294-300, Jun 1999. ISSN 0952-7915. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10375557 >.

37 WATERHOUSE, P. et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. **Science,** v. 270, n. 5238, p. 985-8, Nov 1995. ISSN 0036-8075. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7481803 >.

38 TIVOL, E. et al. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. **Immunity,** v. 3, n. 5, p. 541-7, Nov 1995. ISSN 1074-7613. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7584144 >.

39 DEICHMANN, K. et al. An Mse I RFLP in the human CTLA4 promotor. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 225, n. 3, p. 817-8, Aug 1996. ISSN 0006-291X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8780695 >.

40 WANG, X. B. et al. A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. **Genes Immun,** v. 3, n. 4, p. 233-4, Jun 2002. ISSN 1466-4879. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058260 >.

41 KOTSA, K.; WATSON, P.; WEETMAN, A. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. **Clin Endocrinol (Oxf),** v. 46, n. 5, p. 551-4, May 1997. ISSN 0300-0664.

Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9231050 >.

42 BAN, Y. et al. Association of a CTLA-4 3' untranslated region (CT60) single nucleotide polymorphism with autoimmune thyroid disease in the Japanese population. **Autoimmunity,** v. 38, n. 2, p. 151-3, Mar 2005. ISSN 0891-6934. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16040335 >.

43 TOMER, Y. et al. CTLA-4 and not CD28 is a susceptibility gene for thyroid autoantibody production. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 86, n. 4, p. 1687-93, Apr 2001. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11297604 >.

44 WANG, P. et al. Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 gene polymorphism and hyperthyroid Graves' disease relapse after antithyroid drug withdrawal: a follow-up study. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 92, n. 7, p. 2513-8, Jul 2007. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17426089 >.

45 SANTOS, R. B. **Perfil genético de risco para doença de Graves e oftalmopatia de Graves eu uma população brasileira.** 2009. 84 Clínica Médica, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas., Campinas.

46 YEŞILKAYA, E. et al. CTLA4 gene polymorphisms in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases. **Genet Test,** v. 12, n. 3, p. 461-4, Sep 2008. ISSN 1090-6576. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18752454 >.

47 BICEK, A. et al. 49A/G and CT60 polymorphisms of the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 gene associated with autoimmune thyroid disease. **Hum Immunol,** v. 70, n. 10, p. 820-4, Oct 2009. ISSN 1879-1166. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559744 >.

48 NAMO CURY, A. et al. Graves' disease in Brazilian children and adults: lack of genetic association with CTLA-4 +49A>G polymorphism. **Horm Res,** v. 70, n. 1, p. 36-41, 2008. ISSN 1423-0046. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18493148 >.

[49] MOJTAHEDI, Z. et al. CTLA-4 +49 A/G polymorphism is associated with predisposition to type 1 diabetes in Iranians. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 68, n. 2, p. 111-6, May 2005. ISSN 0168-8227. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15860238 >.

[50] GAMBERINI, M.; MAINARDI-NOVO, D.; ALVES, L. **Associação do polimorfismo + 49 A/G no exon 1 do gene CTLA-4 com diabetes melito tipo 1 e suas apresentações clínicas.** Arq Bras Endocrinol Metabol;. 50 2006.

[51] HAUACHE, O. M. et al. Estimation of diabetes risk in Brazilian population by typing for polymorphisms in HLA-DR-DQ, INS and CTLA-4 genes. **Dis Markers,** v. 21, n. 3, p. 139-45, 2005. ISSN 0278-0240. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16276008 >.

[52] KAVVOURA, F. et al. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 92, n. 8, p. 3162-70, Aug 2007. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17504905 >.

[53] IKEGAMI, H. et al. The association of CTLA4 polymorphism with type 1 diabetes is concentrated in patients complicated with autoimmune thyroid disease: a multicenter collaborative study in Japan. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 91, n. 3, p. 1087-92, Mar 2006. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16352685 >.

[54] BOTTINI, N. et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. **Nat Genet,** v. 36, n. 4, p. 337-8, Apr 2004. ISSN 1061-4036. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15004560 >.

[55] GREGERSEN, P.; BEHRENS, T. Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. **Nat Rev Genet,** v. 7, n. 12, p. 917-28, Dec 2006. ISSN 1471-0056. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17139323 >.

[56] VANG, T. et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. **Nat Genet,** v. 37, n. 12, p. 1317-9, Dec 2005. ISSN 1061-4036. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16273109 >.

[57] HASEGAWA, K. et al. PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. **Science,** v. 303, n. 5658, p. 685-9, Jan 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14752163 >.

[58] HEWARD, J. et al. Association of PTPN22 haplotypes with Graves' disease. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 92, n. 2, p. 685-90, Feb 2007. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17148556 >.

[59] DULTZ, G. et al. The protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T polymorphism is a joint susceptibility locus for immunthyroiditis and autoimmune diabetes. **Thyroid,** v. 19, n. 2, p. 143-8, Feb 2009. ISSN 1557-9077. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19090780 >.

[60] BOTTINI, N. et al. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. **Semin Immunol,** v. 18, n. 4, p. 207-13, Aug 2006. ISSN 1044-5323. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697661 >.

[61] VELAGA, M. et al. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 89, n. 11, p. 5862-5, Nov 2004. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15531553 >.

[62] SKÓRKA, A. et al. Lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22/LYP) variant and Graves' disease in a Polish population: association and gene dose-dependent correlation with age of onset. **Clin Endocrinol (Oxf),** v. 62, n. 6, p. 679-82, Jun 2005. ISSN 0300-0664. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15943829 >.

63 CHABCHOUB, G. et al. The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase 22 gene in autoimmune thyroid diseases and rheumatoid arthritis in the Tunisian population. **Ann Hum Biol,** v. 36, n. 3, p. 342-9, 2009 May-Jun 2009. ISSN 1464-5033. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19343596 >.

64 ICHIMURA, M. et al. Associations of protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 (PTPN22) gene polymorphisms with susceptibility to Graves' disease in a Japanese population. **Thyroid,** v. 18, n. 6, p. 625-30, Jun 2008. ISSN 1050-7256. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18578611 >.

65 CHELALA, C. et al. PTPN22 R620W functional variant in type 1 diabetes and autoimmunity related traits. **Diabetes,** v. 56, n. 2, p. 522-6, Feb 2007. ISSN 0012-1797. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17259401 >.

66 GAMBERINI, M. et al. **Genetic Association between the Lymphoid Tyrosine Phosphatase Locus (LYP/*PTPN22*) with type 1 diabetes in caucasians**. Program of the 89th Annual Meeting of the Endocrine Society, Toronto, CA, poster session 2007.

67 CHISTIAKOV, D. A. Interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) and virus-induced autoimmunity: a review. **Viral Immunol,** v. 23, n. 1, p. 3-15, Feb 2010. ISSN 1557-8976. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20121398 >.

68 KATO, H. et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature,** v. 441, n. 7089, p. 101-5, May 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16625202 >.

69 VON HERRATH, M. Diabetes: A virus-gene collaboration. **Nature,** v. 459, n. 7246, p. 518-9, May 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19478773 >.

70 SMYTH, D. et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. **Nat Genet,** v. 38, n. 6, p. 617-9, Jun 2006. ISSN 1061-

4036. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16699517 >.

71 JERMENDY, A. et al. The interferon-induced helicase IFIH1 Ala946Thr polymorphism is associated with type 1 diabetes in both the high-incidence Finnish and the medium-incidence Hungarian populations. **Diabetologia,** v. 53, n. 1, p. 98-102, Jan 2010. ISSN 1432-0428. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19841890 >.

72 LIU, S. et al. IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells. **Hum Mol Genet,** v. 18, n. 2, p. 358-65, Jan 2009. ISSN 1460-2083. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18927125 >.

73 AMINKENG, F. et al. IFIH1 gene polymorphisms in type 1 diabetes: genetic association analysis and genotype-phenotype correlation in the Belgian population. **Hum Immunol,** v. 70, n. 9, p. 706-10, Sep 2009. ISSN 1879-1166. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19539001 >.

74 SUTHERLAND, A. et al. Genomic polymorphism at the interferon-induced helicase (IFIH1) locus contributes to Graves' disease susceptibility. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 92, n. 8, p. 3338-41, Aug 2007. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17535987 >.

75 PENNA-MARTINEZ, M. et al. The rs1990760 polymorphism within the IFIH1 locus is not associated with Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and Addison's disease. **BMC Med Genet,** v. 10, p. 126, 2009. ISSN 1471-2350. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19961590 >.

76 DUARTE, G. C. et al. [Echographic evaluation of the thyroid gland and urinary iodine concentration in school children from various regions of the State of São Paulo, Brazil]. **Arq Bras Endocrinol Metabol,** v. 48, n. 6, p. 842-8, Dec 2004. ISSN 0004-2730. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761558 >.

77 BAHN, R. S. et al. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. **Endocr Pract,** v. 17, n. 3, p. 456-520, 2011 May-Jun 2011. ISSN 1934-2403. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700562 >.

78 RIVKEES, S. A.; DINAUER, C. An optimal treatment for pediatric Graves' disease is radioiodine. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 92, n. 3, p. 797-800, Mar 2007. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17341574 >.

79 KRASSAS, G. E.; SEGNI, M.; WIERSINGA, W. M. Childhood Graves' ophthalmopathy: results of a European questionnaire study. **Eur J Endocrinol,** v. 153, n. 4, p. 515-21, Oct 2005. ISSN 0804-4643. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16189172 >.

80 GARBER, J. R. et al. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. **Endocr Pract,** v. 18, n. 6, p. 988-1028, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1934-2403. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23246686 >.

81 CHISTIAKOV, D.; TURAKULOV, R. CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. **J Mol Endocrinol,** v. 31, n. 1, p. 21-36, Aug 2003. ISSN 0952-5041. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12914522 >.

82 KINJO, Y. et al. Remission of Graves' hyperthyroidism and A/G polymorphism at position 49 in exon 1 of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 gene. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 87, n. 6, p. 2593-6, Jun 2002. ISSN 0021-972X. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12050220 >.

83 HAN, S. et al. CTLA4 polymorphisms and ophthalmopathy in Graves' disease patients: association study and meta-analysis. **Hum Immunol,** v. 67, n. 8, p. 618-26, Aug 2006. ISSN 0198-8859. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16916658 >.

84 ZHANG, Q.; YANG, Y. M.; LV, X. Y. Association of Graves' disease and Graves' ophthalmopathy with the polymorphisms in promoter and exon 1

of cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 gene. **J Zhejiang Univ Sci B,** v. 7, n. 11, p. 887-91, Nov 2006. ISSN 1673-1581. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17048303 >.

85 UEDA, H. et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. **Nature,** v. 423, n. 6939, p. 506-11, May 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12724780 >.

86 PETRONE, A. et al. CT60 single nucleotide polymorphisms of the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene region is associated with Graves' disease in an Italian population. **Thyroid,** v. 15, n. 3, p. 232-8, Mar 2005. ISSN 1050-7256. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15785242 >.