

Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE
PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA
AO DIABETES MELLITUS
TIPO 1 (DM1).**

Programa de Pós Graduação em Genética

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Aluno: Alessandro Clayton de Souza Ferreira

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Brunialti Godard

Co-orientador: Dr. Victor Cavalcanti Pardini

BELO HORIZONTE – Fevereiro de 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Dedico este trabalho a minha esposa
Cristiane, pelo amor, apoio, e
compreensão. E a meus pais, Raul e
Côte, pelo exemplo de caráter,
trabalho, honestidade.**

Agradecimentos:

A minha orientadora, Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard, pelo carinho, amizade e incentivo. Por ter me dado a oportunidade de aprender. Por ter me mostrado o que é ciência e me ajudado a conquistar meus objetivos. Pelo exemplo de pesquisadora e de pessoa.

A meu co-orientador Dr. Victor Cavalcanti Pardini, pela amizade de sempre, por abrir as portas de seu laboratório e proporcionar a concretização do meu sonho. Pelo exemplo de busca constante por nossos objetivos.

A minha amiga Karina Braga Gomes pelo apoio, carinho e amizade incondicional. Pelas conversas científicas e pelo profundo interesse neste projeto.

Ao Dr. Ivan Sampaio pela ajuda nas análises estatísticas e por me ensinar a envergar um pouco mais longe.

A Dra. Cleusa Graça Fonseca, pelas conversas e ensinamentos que muito engrandeceram este projeto e meus conhecimentos.

Aos demais professores e alunos da Pós-graduação em Genética pelo agradável convívio durante o período que convivemos.

Ao Instituto Hermes Pardini, na pessoa do Dr. Hermes Pardini, pelo apoio na realização dos experimentos e incentivo na conclusão do mestrado.

Aos meus colegas do Departamento de Genética do Instituto Hermes Pardini.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	5
1 Introdução	6
2 Artigo 1 - Type 1 diabetic susceptibility encode by HLA, CTLA-4 and insulin gene in Brazilians subjects.	16
3 Artigo 2 - Evidência de influência genética na idade de manifestação da diabetes tipo 1 em indivíduos brasileiros.	32
4 Conclusão	41
5 Referências Bibliográficas	44
6 Apêndice 1 – Modelo do Termo de consentimento livre e esclarecido	52
7 Anexo 1 – Parecer do Comitê de ética em pesquisa.	53

RESUMO

O diabetes mellitus Tipo 1 (DM1) ou insulino-dependente é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, na qual fatores genéticos e ambientais desempenham papel relevante no seu desencadeamento. O DM1 afeta indivíduos geneticamente susceptíveis e se manifesta clinicamente quando ocorre uma

destruição significativa das células beta pancreáticas, levando a uma severa insulinopenia.

Diversos trabalhos têm sugerido a existência de uma ligação genética entre susceptibilidade ao DM1 com a região HLA (Antígenos Leucocitários Humanos), assim como com o gene CTLA-4 e com o gene da insulina. Neste trabalho estudamos a relação entre polimorfismos presentes nos genes citados com a predisposição genética ao DM1 assim como a influência destes polimorfismos com a idade de manifestação da doença.

A análise dos alelos do locos HLA confirmou a importância dos alelos DQB1*02, DQB1*0302 e DQA1*03 na predisposição ao DM1. Também observamos a importância de DQB1*0301 na proteção contra o desenvolvimento da doença. Utilizamos a análise fatorial discriminante para verificar o poder de discriminação dos marcadores estudados, ou seja, para verificar se baseado apenas nos dados moleculares obtidos se conseguiríamos discriminar os indivíduos testados em diabéticos e não diabéticos. A análise revelou que os alelos de predisposição do locos HLA DQA1 consegue discriminar sozinho 71,3% dos indivíduos entre diabéticos e não diabéticos. Junto com os alelos de predisposição do locos HLA DQB1 este poder de discriminação sobe para 82,47%.

Utilizando a análise de componentes principais foi possível verificar uma associação negativa entre o alelo de predisposição genética do gene CTLA-4 e a idade de manifestação da doença. Isto significa que indivíduos que possuem este alelo de predisposição tendem a desenvolver diabetes mais precocemente.

INTRODUÇÃO:

Diabetes é uma doença caracterizada por hiperglicemia crônica e desordem de carboidratos, lípidos e proteínas e é associado com desenvolvimento

de complicações microvasculares e doenças macrovasculares (Pickup & Williams, 1991).

O diabetes foi reconhecido como uma síndrome em 1875 por Bouchard, que o classificou como “diabète maigre” e “diabète gras” os dois tipos de manifestação clínica com diferentes prognósticos e diferentes tratamentos. No século 20, o diabetes foi classificado de acordo com a idade de surgimento ou severidade do distúrbio metabólico, usando termos como “juvenil”, “da maturidade”, “estável” e “instável”. Várias descobertas e conhecimentos adquiridos levaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1985 a classificar o Diabetes Mellitus da seguinte maneira (WHO Study Group, 1985):

1. Diabetes Mellitus não insulino dependente : (a) não obeso e (b) obeso,
2. Diabetes Mellitus gestacional,
3. Diabetes Mellitus associado a má nutrição,
4. Outros tipos de Diabetes Mellitus associada com condições específicas e síndromes,
5. Diabetes Mellitus insulino dependente,

O diabetes mellitus não insulino dependente ou diabetes tipo 2 é a forma mais comum de diabetes, afetando 1 a 2% da população caucasiana (Mather, 1985) e chegando a 5% em países em desenvolvimento como a Índia (Zimmet, 1983). Este tipo de diabetes ocorre predominantemente em adultos e estes indivíduos não são dependentes de insulina exógena, sendo que a maioria deles apresenta níveis elevados de glicose, insulina, lipídeos além de hipertensão. O diabetes tipo 2 geralmente está associado a defeitos no receptor de insulina (Greenspan & Baxter, 1994)

Em algumas populações a presença de efeito fundador pode ser demonstrada, como por exemplo, na ilha de Nauru no pacífico Sul, onde 85% da população acima de 60 anos possui diabetes tipo 2 (Serjeantson et al., 1983). É interessante notar que em populações onde existem uma alta incidência de diabetes tipo 2 a distribuição dos níveis séricos de glicose tendem a ser bimodais (Nauru e índios Pima), sugerindo defeito em um único gene (Fajans, 1987).

A base genética do diabetes tipo 2 é demonstrada pela alta taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos, que chega a ser de 91%, sendo que mesmo entre os gêmeos não concordantes na doença clássica, algum tipo de anormalidade metabólica é encontrada (Gottlieb et al., 1968, Barnett et al., 1981). A herança do diabetes tipo 2 é aparentemente poligênica na maioria das famílias analisadas, com exceção de um tipo raro de diabetes tipo 2 chamado MODY (maturity-onset diabetes of the young), uma doença causada por um defeito no gene da glucoquinase, e que é transmitida de forma autossômica dominante (Tattersal, 1974, Winter, 1987).

O diabetes mellitus gestacional é definido como o diabetes que inicia ou é reconhecido durante a gravidez, geralmente após a 24ª semana gestacional. Aproximadamente 50% das mães que desenvolvem diabetes gestacional reverterem ao estado normal após o parto, contudo a doença pode reaparecer em gestações subsequentes. No primeiro trimestre de gravidez não diabética, a ação da insulina é intensificada por estrógenos e progesterona e os níveis séricos de glicose tendem a cair. No final da gravidez, de maneira inversa ao início a tolerância a glicose fica ligeiramente reduzida e os níveis de insulina aumentam, sugerindo uma resistência a este hormônio, sendo que esta resistência parece ser um fenômeno pós receptor. Alguns investigadores recomendam insulino-terapia no diabetes gestacional (Foster & Wilson, 1988).

Permanece ainda a dúvida se o diabetes gestacional se caracteriza por mulheres grávidas que apresentam tolerância a glicose somente em função da gravidez ou se esta gravidez induziria o aparecimento de uma propensão à intolerância a glicose que, desta forma, se apresentaria mais tarde, no estado de não gravidez ou imediatamente após o parto (Landon et al., 1992)

Algumas outras síndromes podem ocasionar diabetes mellitus, entre elas podemos citar hemocromatose, fibrose cística, síndrome de Berardinelli-Seip, Acromegalia, Síndrome de Cushing (Starkman et al., 2004, Gomes et al., 2004, Catargi et al. 2003). Nestes casos a prevalência e influência de fatores genéticos e ambientais dependem da síndrome específica que ocasionou o diabetes (Kozak et al., 1985, Endreffy et al., 1997).

O diabetes mellitus associado à má nutrição (MRDM) possui etiologia e patogênese heterogêneas. Ocorre principalmente em países tropicais subdesenvolvidos, afetando adolescentes mal nutridos e jovens adultos. Sua prevalência não está estabelecida e pode ser classificada em diabetes pancreática fibrocalculosa e diabetes pancreática deficiente de proteína. As duas manifestações da doença estão associadas a estados nutricionais (Abu-Bakare et al., 1986)

O tipo mais severo de diabetes mellitus é o diabetes mellitus Tipo 1. O diabetes mellitus Tipo 1 (DM1) ou insulino-dependente é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, na qual fatores genéticos e ambientais desempenham papel relevante no seu desencadeamento (Cahill et al., 1981). O DM1 afeta indivíduos geneticamente susceptíveis e se manifesta clinicamente quando ocorre uma destruição significativa das células beta pancreáticas, levando a uma severa insulinopenia (Nerup et al., 1988).

A incidência e a prevalência de DM1 varia em diferentes países e populações, geralmente com um gradiente Norte/Sul (Karvonen et al., 1993), como exemplos podemos citar a alta incidência em países como a Finlândia e Suécia (30 a 40 indivíduos diabéticos por 1000.000 habitantes) e baixa incidência em países como o Japão (1/100.000).

Do ponto de vista patológico, a lesão estrutural que ocorre na célula beta é irreversível, e o tratamento é direcionado para aliviar os sintomas, restaurar a euglicemia e prevenir as complicações agudas e crônicas que contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade da doença.

Várias são as evidências de que a destruição das células beta no DM1 seria um processo autoimune, dentre elas podemos citar a presença de infiltrado de linfócitos no pâncreas (insulite), as múltiplas anormalidades no sistema imunológico como presença de autoanticorpos como anti-GAD, anti-IA2, anti-insulina e anti-ilhota. (Greenspan & Baxter, 1994, Pardini et al., 1999), e a interrupção da progressão da deficiência de insulina em animais com o uso de imunossupressores (Todd, 1990).

No início dos anos 80, foi introduzido o conceito de que as alterações imunológicas e metabólicas encontradas nos pacientes DM1 teriam ocorrido vários anos antes do aparecimento da hiperglicemia sintomática (Gorsuch et al. 1981). Segundo este conceito, o desenvolvimento do DM1 pode ser dividido em seis estágios (Eisenbarth, 1986). O primeiro estágio seria a predisposição genética, onde o indivíduo possuiria o(s) alelo(s) do(s) gene(s) que conferem susceptibilidade para desenvolver a doença. O segundo estágio seria caracterizado por fatores ambientais que desencadeariam o diabetes. No terceiro estágio, alterações imunológicas ocorreriam e anticorpos contra células beta poderiam ser detectados, porém a secreção de insulina ainda estaria normal. No quarto estágio, ocorreria uma perda gradual da secreção de insulina, mas, a glicemia permaneceria normal. O quinto estágio seria caracterizado pela apresentação clínica do DM1, onde o peptídeo-C ainda estaria presente representando uma secreção de insulina residual. Enfim, no sexto estágio, ocorreria a destruição completa das células beta e o peptídeo-C não seria mais detectável. Este período que precede o aparecimento do diabetes clínico é chamado de pré-diabetes.

Alguns trabalhos realizados com o camundongo NOD (nonobese diabetic mouse) (Leiter, 1997), um modelo animal que desenvolve diabetes autoimune espontaneamente semelhante à DM1 dos humanos, mostraram que a tolerização com algumas substâncias como análogos inativos de insulina e descarboxilase do ácido glutâmico (GAD), podem adiar ou prevenir o surgimento de DM1 quando administradas na fase de pré-diabetes (Petersen et al., 1994; Karounnos et al., 1997).

Outro modo de prevenção contra o surgimento de DM1 em indivíduos susceptíveis seria a estratégia terapêutica proposta pelo DPT-1 (Diabetes Prevention Trial) um consórcio norte americano formado por vários centros médicos (Wilson et al. 2001). Neste caso, são realizadas aplicações subcutâneas e endovenosas por quatro dias, durante nove meses, de insulina em baixas dosagens. Em uma triagem piloto, essa terapia preveniu o surgimento de DM1 em 80% dos indivíduos geneticamente susceptíveis (Keller et al., 1993).

Ainda em relação a um tratamento preventivo, foi demonstrado que terapia com imunoglobulina intravenosa tem um efeito benéfico no curso natural do desenvolvimento do DM1 (Colagiuri et al., 1996).

Trabalhos recentes mostraram que a terapia celular, utilizando células tronco tanto adultas quanto embrionárias, provavelmente será a grande conquista para o tratamento do diabetes tipo 1. Células tronco estão sendo utilizadas para reposição de células produtoras de insulina e para diminuição de reação autoimune, tanto em cobaias quanto em humanos, com resultados bastante satisfatórios (Heit et al., 2004, Zalzman et al., 2003, Burt et al., 2002).

Para que os tratamentos de prevenção ao surgimento de DM1 sejam eficientes é necessário que eles sejam iniciadas ainda no primeiro estágio da doença, antes do início do desenvolvimento dos fenômenos imunológicos de destruição das células beta. Para isto, estudos genéticos de predisposição se fazem necessários no intuito de se identificar corretamente os indivíduos geneticamente predispostos.

Evidências do envolvimento genético na etiologia do DM1 podem ser observadas através estudos de gêmeos, estudos em famílias com alto número de diabéticos e em populações com alta prevalência da doença. Entre gêmeos monozigóticos há uma concordância de 30-50% em relação a manifestação da doença. A taxa de discordância sugere que o DM1 é multifatorial onde fatores ambientais são determinantes para o desenvolvimento da doença (Barnet et al., 1981).

Diversos trabalhos têm sugerido a existência de uma ligação genética entre susceptibilidade ao DM1 com a região HLA (Antígenos Leucocitários Humanos). A região de HLA é um cluster de genes presentes no cromossomo 6 que codificam glicoproteínas encontradas na superfície da maioria das células. São estas proteínas que auxiliam o sistema imunológico a distinguir o que é próprio do organismo (por exemplo, células beta do pâncreas) do que é exógeno (proteínas de vírus e bactérias).

Os genes de HLA codificam proteínas do chamado “complexo maior de histocompatibilidade” ou MHC. Existem duas classes principais de proteínas MHC;

o MHC de classe I, presente no interior das células e o MHC de classe II, expresso na superfície celular. Em teoria, as células do sistema imunológico, em especial as células T, auxiliadas pelas proteínas codificadas por genes de HLA, deveriam se ligar apenas a proteínas exógenas. Entretanto, em algumas ocasiões, estas células acabam se ligando a proteínas próprias do organismo, ocasionado as chamadas doenças autoimunes, como o DM1.

Existem vários genes de HLA, cada um chegando a possuir dezenas de alelos, o que permite que existam inúmeros tipos diferentes de proteínas de MHC (Thorsby, 1974). Alguns genes de HLA estão particularmente envolvidos na patogênese do DM1. Sabe-se que grande parte dos pacientes com DM1 possuem alelos de predisposição genética do HLA DRB1, principalmente os alelos de DRB1*04, sendo então considerados de alto risco para desenvolvimento de DM1 (Rewers et al., 2003, Rouek et al., 2002).

Análises de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) têm demonstrado que há maior associação de desenvolvimento de DM1 com moléculas codificadas pelo locus HLA-DQ do que o HLA-DR (Kim et al., 1985). Evidências confirmando este fato demonstram que a ausência do ácido aspártico na posição 57 da cadeia DQB está positivamente relacionada ao DM1 (Todd e al., 1987). Também já foi demonstrado que, da mesma forma que DQB, a cadeia DQ- α contendo arginina na posição 52, está associada a susceptibilidade ao DM1 (Khalil, 1990). Contrariamente a predisposição associada aos locos de HLA DRB1*04, alguns alelos do locus de HLA DRB1*02 associados principalmente com DQB1*0602 estão relacionados com uma proteção ao surgimento de DM1 (Thai e Al. 1993).

Estudos têm demonstrado que além do HLA, outros fatores genéticos estão relacionados com a predisposição ao surgimento e desenvolvimento de DM1. Atualmente já existe aproximadamente dezoito locos associados a predisposição genética ao surgimento da doença (Buzzeti e al., 1998; Esposito e al., 1998). Os diferentes locos foram classificados de acordo com a tabela mostrada abaixo.

LOCUS	CROMOSSOMO	GENE OU MARCADOR
IDDM1	6p.21	HLA
IDDM2	11p15.5	INS-VNTR (insulina)
IDDM3	15q26	D15S107
IDDM4	11q13.3	FGF3, D11S1917
IDDM5	6q25	ESR, MnSOD
IDDM6	18q12-q21	Kidd locus, D18S64
IDDM7	2q31-33	D2S152
IDDM8	6q25-27	D6S281
IDDM9	3q21-25	D3S1303
IDDM10	10p11-q11	D10S193
IDDM11	14q24.3-q31	D14S67
IDDM12	2q33	CTLA-4
IDDM13	2q34	D2S137
IDDM14	Não determinado	Não determinado
IDDM15	6q21	D6S283
IDDM16	14q32.3	Imunoglobulina de cadeia pesada
IDDM17	q10	Não determinado
IDDM18	q5	ILB12

Dentre os locos listados acima, os que são possuem maior associação com predisposição genética ao DM1, além do locus de HLA são os relacionados com o gene CTLA-4 (IDDM12) e com o gene da insulina (IDDM2)(Anjos et al., 2004a, Rollandsson et al. 2003)

Outro locus bastante importante na susceptibilidade ao desenvolvimento do DM1 é o INS-VNTR (IDDM2). Este é um minissatélite localizado no braço curto do cromossomo 11, entre o gene da tirosina hidroxilase e o gene da insulina. Foi descrito que a proteção ou a predisposição genética ao surgimento da doença também está relacionada ao genótipo encontrado para o INS-VNTR e que ele teria papel regulatório na expressão do gene da insulina (Owerbach et al., 1993). Além deste minissatélite, outros polimorfismos de base única no gene da insulina estão relacionados ao surgimento e desenvolvimento do DM1. Como exemplo de um desses polimorfismos podemos citar a perda do sítio de restrição para a enzima *MspI* na posição 2221 na região 5' do gene da insulina (-2221 *MspI*) (Stead et al., 2000, Haller et al., 2004).

O gene CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Associated antigen-4) também é descrito como um dos genes mais fortemente associados na predisposição genética ao DM1 (Anjos et al., 2004b, Haller et al., 2003). O gene CTLA4 está localizado na região cromossômica 2q33 e codifica um receptor de células T. Seu produto está envolvido no controle da proliferação de células T e na apoptose mediada por esta célula. Deste modo, o gene CTLA-4 é um forte candidato a doenças autoimunes mediadas por células T como o DM1 (Marrom et al., 1997). Dentre estes polimorfismos, destaca-se a transição de uma adenina para uma guanina (A→G) na posição 49 no primeiro exon do gene CTLA-4 e um microsatélite do tipo (AT)_n na extremidade 3' do mesmo (Fajardy et al., 2002; Abe et al., 2001).

Recentemente vários trabalhos surgiram buscando estabelecer uma relação funcional entre alguns genes e a DM1. Entre os genes estudados podemos citar o SUMO-4 (Small Ubiquitin-Related Modifier 4) uma variante da família de genes SUMO (Boggio et al., 2004.). Esses genes estão relacionados com a localização, marcação e estabilidade de proteínas celulares. Uma mutação denominada M55V (substituição de um metionina por uma valina na posição 55) gera um aumento de expressão de uma proteína do tipo HSP (Heat Shock Protein) em células beta pancreáticas. Anticorpos anti proteína HSP são encontrados em pacientes com doenças autoimunes como DM1 (Bohren et al., 2004, Jones et al., 1993). Um segundo gene seria o T-bet (T-box transcription factor gene) cujo produto gênico contribui para a indução de interferon Gama por linfócito T helper (Sasaki et al., 2004). Estudos sugerem que mutações no gene T-bet podem ocasionar uma perda do controle das reações autoagressivas de linfócitos T CD8, gerando assim um processo autoimune (Juedes et al., 2004).

Outra característica interessante do ponto de vista clínico da DM1 é a idade de manifestação da doença. Apesar de ser caracterizada pela manifestação durante a infância e a adolescência, esta idade pode variar desde algumas semanas de vida até depois dos vinte anos. Alguns trabalhos foram feitos no intuito de verificar uma possível associação entre a presença de um ou mais alelos

de predisposição e a idade de manifestação do diabetes (Valdes et al., 1999, Murao et al., 2004, Pitkaniemi et al., 2004).

Vários estudos em diversas populações do mundo têm mostrado a associação entre os alelos de HLA, o gene CTLA-4 e os polimorfismos na região 5' do gene da insulina com o risco de desenvolvimento de DM1 (Mein et al., 1998; Donner et al., 1998). Entretanto, devido ao alto polimorfismo destes marcadores, cada população estudada mostra um perfil diferente de associação com a doença.

Na população brasileira, caracterizada pela sua alta heterogeneidade, poucos estudos foram realizados procurando elucidar a associação entre marcadores genéticos e predisposição ou proteção genética ao desenvolvimento de DM1 e estes estudos são limitados ao locos HLA (Marques et al., 1998, Volpini et al., 2001, Eizirik et al., 1987).

O estudo de alguns marcadores de predisposição conhecidos, aliado ao fato que a DM1 possui um período prodrômico de longa duração, oferece a possibilidade de identificarmos em uma população, indivíduos com predisposição genética ao desenvolvimento de DM1 antes mesmo que este entre no segundo estágio do desenvolvimento do diabetes, ou seja, antes que se inicie a perda de células beta. Esta detecção precoce possibilitaria o início de tratamentos clínicos que visam retardar ou mesmo impedir o surgimento da doença.

Em nosso trabalho procuramos estabelecer, utilizando a frequência dos alelos dos locos HLA DQB1, DQA1, DRB1, do polimorfismo 49 A→G do gene CTLA-4 e do polimorfismo -2221 *Msp* I do gene da insulina em indivíduos afetados e não afetados pelo DM1, quais seriam os principais marcadores genéticos que estariam envolvidos na predisposição genética do DM1 e eventualmente estariam envolvidos na idade de manifestação da doença,

Para a determinação da predisposição genética ao DM1, utilizamos o método de Woolf (Woolf, 1955). Este determina o risco relativo do surgimento da doença baseado na frequência alélica dos marcadores estudados entre indivíduos afetados e não afetados pelo diabetes. A análise fatorial discriminante foi utilizada para separar os indivíduos analisados em diabéticos e não diabéticos baseados somente nos dados da análise molecular. A proposta desta análise é, com base

na presença e ausência de alelos de risco, verificar se os grupos inicialmente propostos (pacientes e controles) são realmente distintos entre si. Ao definir um grupo, a análise permite verificar quais, dentre os marcadores genéticos estudados, os que mais caracterizam ou discriminam este grupo.

Além disto, utilizando uma ferramenta estatística denominada análise fatorial de componentes principais (Pearson, 1901), estabelecemos a relação dos alelos dos locos HLA DQB1, DQA1, DRB1, do polimorfismo 49 A→G do gene CTLA-4 e do polimorfismo –2221 *Msp* I com a idade de manifestação de DM1.

A análise fatorial de componentes principais permite que um certo número de variáveis seja analisado concomitantemente. Isto torna possível verificar as relações existentes entre elas por meio de uma abordagem descritiva, onde através de um modelo gráfico, podemos observar o comportamento de cada variável em relação às demais (Person, 1901, Hoteling, 1933).

Os resultados destes estudos, assim como sua metodologia e conclusões estão apresentadas nos dois trabalhos que se seguem. No primeiro trabalho estabelecemos os riscos relativos de desenvolvimento de DM1 através das frequências alélicas dos marcadores genéticos estudados em pacientes e controles.

No segundo trabalho, analisando apenas indivíduos diabéticos, relacionamos os marcadores genéticos com a idade de surgimento da doença.

Artigo 1

Type 1 diabetic susceptibility encode by HLA, CTLA-4 and insulin gene in Brazilians subjects.

Ferreira ACS^{1,3}, Gomes KB^{3,4}, Sampaio IB², Pardini VC³, Godard ALB¹

1-Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

2-Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

3-Departamento de Genética Humana, Instituto Hermes Pardini.

4-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

Abstract

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) results from a cellular-mediated autoimmune destruction of β -cells of the pancreas. The HLA region accounts for approximately 50% of the genetic susceptibility to T1DM (8, 9), suggesting that the sum of the effects of other susceptibility loci is, approximately, as great as the HLA effect. There are several candidate gene regions for T1DM susceptibility. In the Brazilian population, which is characterized by its great heterogeneity, only HLA has been studied. The aim of this study was to expand the analysis of effect of HLA, CTLA-4 and promoter region of insulin gene (polymorphism -2221 *Msp I*) on T1DM in Brazilians.

Ours results show that, in the analyzed individuals, the main predisposition alleles are DQB1*02 (RR=4.66), DQB1*0302 (RR=3.84) and DQA1*03 (RR=3.0). CTLA-4 and -2221 *Msp I* has no significant association with genetic predisposition to T1DM. The discriminating factorial analysis performed shows that the markers that best characterize and discriminate the two studied groups (diabetic and non diabetic) are DQA1 and DQB1.

Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) results from a cellular-mediated autoimmune destruction of β -cells of the pancreas (1). Although T1DM has always been recognized as a childhood disease, recent epidemiological studies have indicated that the incidence is comparable in adults (2). There is an enormous variation in the worldwide incidence of T1DM. In Finland, the incidence is 30-40 per 100,000 inhabitants, but in Japan this incidence is 1 per 100,000 inhabitants (3,4). In Brazilian populations the value was estimated at 7.6 per 100,000 inhabitants (5, 6). Susceptibility to T1DM involves both genetic and environmental components. Genetic associations with T1DM were observed almost 30 years ago (7), but the full knowledge of genetic susceptibility loci has not yet been elucidated.

The HLA region accounts for approximately 50% of the genetic susceptibility to T1DM (8, 9), suggesting that the sum of the effects of other susceptibility loci is, approximately, as great as the HLA effect.

There are several candidate gene regions for T1DM susceptibility. However, many of the candidate gene regions were not associated with T1DM in various populations studied (10). For example, outside the HLA region, there are two gene regions that appear to have a stronger effect in T1DM. The cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) gene is on the chromosome 2q33 region. It encodes the T cell receptor involved in the control of T cell proliferation and mediates T cell apoptosis. This gene is a strong candidate for T cell-mediated autoimmune diseases like T1DM (11, 12). There is a polymorphism in exon 1 at position 49 (A→G) that encodes for threonine (Thr) or alanine (Ala), respectively (13, 14). The CTLA-4 G allele has been associated with T1DM in many populations (15, 16, 17, 18).

A second region is the insulin gene localized on human chromosome 11p15.5. There are some polymorphisms in this gene which have been reported to be in a strong association with T1DM (19, 20). The association between the promoter region of the insulin gene and the CTLA-4 polymorphism may vary among populations. (21, 22, 23).

In the Brazilian population, which is characterized by its great heterogeneity (24), only HLA has been studied in association with T1DM in several works (25, 26, 27, 28, 29). Volpini et col., using affected family-based controls (AFBAC) method to study 56 Southeastern Brazilian families, showed increased frequencies of the DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*02 and DRB1*0401-DQA1*03-DQB1*0302

haplotypes in the patient group and a lack of significant protecting effect of the DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 haplotype. An apparent protection conferred by the DRB1*13-DQB1*0301, DRB1*11-DQB1*0301, and DRB1*01-DQB1*0501 haplotypes was reported. Similar results were found in others studies.

No reports have been published on the association of the polymorphism in the insulin gene and CTLA-4 with T1DM in the Brazilian population. The aim of this study was to expand the analysis of effect of HLA, CTLA-4 and promoter region of insulin gene (polymorphism -2221 *Msp I*) on T1DM in Brazilians.

Material and Methods:

Preparation of genomic DNA:

DNA was extracted from peripheral blood using the PUREGENE® kit. A total of 49 individuals was analyzed with clinical and laboratory diagnoses of type 1 diabetes; they had mean age of 15.76 ± 1.91 and age of diabetes diagnosis of 9.75 ± 4.15 . For the non-diabetic control group, 48 individuals without type 1 diabetes and no family history of the disease were included with mean age of 31.2 ± 5.12 . For the control we used individuals over 25 years of age, so we were more confident that they would not develop type 1 diabetes.

Local ethic committee accepted this study.

Determination of the HLA DQB1, DQA1 and DRB1 alleles

Alleles were detected using the DELFIA® technology (Walac Oy). One microgram of genomic DNA was utilized as a substrate for the PCR reaction of the HLA region

of interest. For amplification of the HLA region the following primers were used: 5' GCA TGT GCT ACT TCA CCA ACG, 3'bio-CCT TCT GGC TGT TCC AGT ACT for DQB1; 5' bio-TAT GGT GTA AAC TTG TAC CAGT, 3' GGT AGC AGC GGT AGA GTT G for DQA1 and 5' GTT TCT TGG AGC AGG TTA AAC A, 3'bio-CTC GCC GCT GCA CTG TGA for DRB1.

Detection of the alleles was performed in the "Time-resolved fluorometer" –1420 VICTOR™ after hybridization with a panel of labeled probes -chelated lanthanids, Eu(III)/Sm(III) and Tb(III)- and time-resolved fluorimetric detection (30, 31).

Determination of the polymorphisms at exon 1 of the CTLA-4 gene and –2221

***Msp I*:**

For detection of the polymorphism at exon 1, position 49 (codon 17) of the CTLA-4 gene (49 A→G CTLA-4) and the polymorphism at 2221 upstream from the insulin gene (-2221 *Msp I*) we utilized the same technology described for the HLA alleles. For the PCR reaction we used the following primers: 5' TTC CTG AAG ACC TGA ACA CC, 3' bio-AAT GAC TGC CCT TGA CTG CT for CTLA4 and 5' ACC CCA CTA CAC GCT GCT G and 3' bio-CCC TTC AGA GAC ACC CCC A, for the -2221 *Msp I* polymorphism.

Statistical Analysis

Data analysis was performed using the POPGENE® software. An odds ratio was calculated according to Woolf's method and, for convention, presented as relative risk. Utilizing the genotyping results, we performed a discriminating factorial

analysis aiming at checking whether the two analyzed groups, diabetic and non-diabetic, could be distinguished between themselves. A second objective would be to find a marker or a set of markers that would best discriminate the two groups.

Results

The results obtained are shown in Tables 1, 2 and 3. Allelic frequency and relative risk were determined for all alleles found. For the CTLA-4 and insulin gene polymorphisms, in addition to the allele frequencies, the genotype frequencies were also determined.

Table 1 – Distribution of HLA-DQB1, HLA-DQA1 e DRB1 allele frequencies in diabetic and normal individuals (non-diabetic). The results were considered significant for $p < 0.05$.

HLA	% IDDM (2n=98)	% Control (2n=96)	Relative Risk	p value
DQB1*02	43.88	14.58	4.66	NS
DQB1*04	2.04	2.08	1.00	NS
DQB1*05	1.02	0.0	-	NS
DQB1*0301	5.10	25.0	0.16	<0.05
DQB1*0302	25.51	8.33	3.84	<0.05
DQB1*0303	0.0	2.08	0.0	NS
DQB1*0304	1.02	1.04	1.0	NS
DQB1*0501	15.31	19.79	0.75	NS
DQB1*0502	1.02	2.08	0.49	NS
DQB1*0503	0.0	5.21	0.0	NS
DQB1*0601	0.0	1.04	0.0	NS
DQB1*0602	1.02	9.38	0.1	NS
DQB1*0603	1.02	5.21	0.19	NS
DQB1*0604	3.06	4.17	0.74	NS
DQA1*03	27.55	9.37	3.0	<0.009
DQA1*05	36.65	19.79	1.68	NS
DQB1*0201	5.10	11.45	0.46	NS
DRB1*0401	4.16	0.0	-	NS
DRB1*0402	6.12	3.06	2.03	NS

DRB1*0403	1.02	1.02	1.0	NS
DRB1*0404	6.12	3.06	2.03	NS
DRB1*0405	11.22	2.04	5.55	NS
DRB1*04	53.06	16.0	3.34	P<0.0009

RR-Relative risk, NS-Non-significant.

Table 2 – Distribution of allele and genotype frequencies for 49 A→G CTLA-4 in diabetic and normal individuals (non-diabetic). The results were considered significant for $p<0.05$.

Allele/genotype	% IDDM	% Control	RR	p value
Allele frequencies				
A	73.47	67.71	1.34	NS
G	26.53	32.29	0.75	NS
Genotype frequencies				
AA	53.06	45.83	1.38	NS
AG	40.81	43.75	0.88	NS
GG	6.12	10.41	0.57	NS

RR-Relative risk, NS-Non-significant

Table 3 – Distribution of allele and genotype frequencies of the -2221/MspI polymorphism at the 11p15.5 region in diabetic patients and normal individuals (non-diabetic). The results were considered significant for $p<0.05$.

Allele/genotype	% IDDM	% Controls	RR	p value
Allele frequencies				
C	87.80	84.40	1.29	NS
T	12.2	15.6	0.77	NS
Genotype frequencies				
CC	79.59	68.75	1.8	NS
CT	20.40	31.75	0.56	NS
TT	0.0	0.0	-	-

RR-Relative risk, NS-Non-significant

We could clearly observe that, in the analyzed individuals, the main predisposition alleles are DQB1*02 (RR=4.66), DQB1*0302 (RR=3.84) and DQA1*03 (RR=3.0). Similar results have been described in the Brazilian population and in other studied populations. We also observed a significant protecting effect of the DQB1*0301 allele which had also been found in several populations (32). For DRB1*04 we did not obtain significant values when the DRB*0401, DRB1*0402, DRB1*0403, DRB1*0404 and DRB1*0405 alleles, for which we did not find significant relative risks, were analyzed. Thus, we decided to make an analysis for the presence or absence of DRB1*04. A relative risk of 3.34 was, then, found ($p < 0.0009$).

It is important to emphasize that both the 49 A→G CTLA-4 and the -2221 Msp 1 polymorphisms, which had previously been shown to be an important risk factor for diabetes development in other populations, were not statistically significant for genetic predisposition for type 1 diabetes in the analyzed individuals.

Discriminating factorial analysis

The discriminating factorial analysis performed shows that the markers that best characterize and discriminate the two studied groups are DQA1 and DQB1, in this order. The remaining studied markers were not helpful in discriminating between diabetic and non-diabetic individuals. Analyzing only the DQA1 marker, we were able to correctly characterize between diabetic and non-diabetic in 71.13% of the analyzed individuals. This means that based on this marker only, 71.13% of the analyzed individuals are correctly classified into diabetic and non-diabetic groups.

When we add the DQB1 marker, this percentage increases to 82.47%. The other markers (DRB*04, CTLA-4 e -2221/Mspl), when added to the discriminating factorial analysis, do not increase this parameter.

Discussion

The great variability in the incidence of type 1 diabetes in the world can, partly, be explained by differences in the frequencies of the disease predisposition alleles.

The analysis of the HLA alleles confirm the importance of the DQB1*02, DQB1*0302 and DQA1*03 alleles in the predisposition for type 1 diabetes. We can also observe the importance of the DQB1*0301 in the protection against development of the disease, since it was more common in non-diabetic individuals.

As for HLA DRB*04, when each allele (DRB*0401, DRB*0402, DRB*0403, DRB*0404 and DRB*0405) were analyzed separately, we did not observe significant values. This is probably due to the limited number of individuals in our study. Thus, we decided to analyze the HLADRB*04, according to its presence or absence, as it had been done in various previous studies. This way, we obtained a relative risk of 3.34 ($p < 0.0009$). This result suggests that the analysis of DRB1*04, without differentiating the several alleles, is a good tool for determining the relative risk for development of diabetes.

The analyses of the 49 A→G CTLA-4 and the -2221/Mspl polymorphism upstream of the insulin gene, contrary to our expectations, did not reveal any association with type 1 diabetes in the analyzed individuals: allele and genotype frequencies of the two polymorphisms are similar in the affected and non-affected individuals. This

fact is particularly surprising regarding the 49 A→G CTLA-4 gene polymorphism since it is strongly associated with diabetes in several populations around the world (33). *Donner et al.*, in 1997, in a study done with 293 Caucasians, showed a relative risk of 1.6 ($p < 0.009$), a value similar to the that found in Finish, Japanese and African populations (34, 35). Although the CTLA-4 gene is strongly associated to autoimmune diseases, specially those mediated by T-cells, the lack of this association has been already described in Brazilian patients with autoimmune hepatitis and primary biliar cirrhosis (36, 37), different from various studies in other populations (38, 39).

The discriminating factorial analysis was extremely important in this work. The objective of this analysis was to verify whether the two proposed groups, diabetic and non-diabetic, were really distinct between themselves, based on the distribution of diabetes predisposition alleles, and also to verify, when defining the groups, which markers or set of markers, among the ones studied, best discriminated the groups.

Our results showed that HLA DQA1 can, alone, characterize 71.13% of the individuals into diabetic and non-diabetic groups; this value is called well-classified percentage. When we introduce the HLA DQB1 in our analysis, the well-classified percentage increases to 82.47. The remaining analyzed markers did not increment this value, since there is a classification overlapping, i.e. who the other markers discriminate as diabetic or non-diabetic had been previously classified by DQA1 and DQB1. Obviously, since type 1 diabetes is a complex and multifactorial disease, where not only genetic but also environmental factors contribute for its development, there are individuals that exhibit the predisposition alleles and do not

show the clinical symptoms and those who do not show the predisposition alleles but are clinically diabetic. For these reasons, the well-classified percentage, shown previously, should not be absolute.

It is worth noting that in our study, the HLA DQA1 allele was more important for distinguishing between diabetic and non-diabetic individuals than DQB1 and DRB1.

Our results confirm the importance of the HLA region for the development of type 1 diabetes in Brazilian individuals, and also demonstrate that 49 A→G at the CTLA-4 gene and -2221/MspI polymorphisms, in principle, are not so important in the genetic predisposition to the disease. However, complementary studies are necessary for evaluating whether other previously described polymorphisms at the CTLA-4 and insulin genes collaborate for predisposition to the disease.

Works utilizing either oral tolerance to some peptides, and utilization of stem cells showed to be efficient for treating and avoiding the onset of type 1 diabetes both in animal models and in humans (40, 41, 42). We believe that the correct identification of individuals with genetic predisposition to the disease can be a useful tool for prescribing these two types of therapy in the near future.

References:

1. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl J Med* 1994;331:1428-1436.
2. Onkamo P, Vaananan S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of type I diabetes – the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia* 1999;42: 1395-403.

3. Tuomilehto J, Virtala E, Karvonen M, Lounamaa R, Pitkaniemi J, Reunanen A, Tuomilehto-Wolf E, Toivanen L. Increase in incidence of insulin-dependent diabetes mellitus among children in Finland. *Int J Epidemiol.* 1995 Oct;24(5):984-92.
4. Abiru N, Kawasaki E, Eguchi K. Current knowledge of Japanese type 1 diabetic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev.* 2002 Sep-Oct;18(5):357-66. Review.
5. Ferreira SR, Franco LJ, Vivolo MA, Negrato CA, Simoes AC, Ventureli CR. Population-based incidence of IDDM in the state of Sao Paulo, Brazil. *Diabetes Care.* 1993 May;16(5):701-4.
6. Lisboa HR, Graebin R, Butzke L, Rodrigues CS. Incidence of type 1 diabetes mellitus in Passo Fundo, RS, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1998 Dec;31(12):1553-6.
7. Singal DP, Blajchman MA. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes.* 1973;22:429-432.
8. Noble JA, Valdes AM, Cook M, et al. The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet.* 1996;59:1134-1148.
9. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature.* 1994;371:130-136.
10. Onegut-Gumuscu S, Concannon P. Mapping genes for autoimmunity in humans: Type 1 diabetes as a model. *Immunol Rev.* 2002;190:182-194.

11. Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunogenet* 1998;18:1901-1905.
12. Robey E, Allison JP. T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol Today* 1995;16:306-309.
13. Gribben JG, Feeman GJ, Boussiotis VA, Rennert P, Jellis CL, Greenfield E, Barber M, Restivo VAJ, Ke X, Gray GS. CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:811-815.
14. Buzzeti R, Nistico L, Pozzili P, et al. The CTLA4 microsatellite identifies a new region on chromosome 2 linked to IDDM. *Diabetologia* 1995;38(Suppl1):A29.
15. Nistico L, Buzzeti R, Pritchard LE, et al. Linkage disequilibrium mapping of type I diabetes susceptibility gene (IDDM7) to chromosome 2q31-q33. *Nat Gen* 1995;9:80-85.
16. Marron MP, Raffel LJ, Garchon H-J, et al. Insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphism in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 1997;6:1275-1282.
17. Kikuoka N, Sugihara S, Yanagawa T, Ikezaki A, Kim HS, Matsuoka H, Kobayashi Y, Wataki K, Konda S, Sato H, Miyamoto S, Sasaki N, Sakamaki T, Niimi H, Murata M. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 gene polymorphism confers susceptibility to type 1 diabetes in Japanese children: analysis of association with HLA genotypes and autoantibodies. *Clin Endocrinol* 2001;55(5):597-603.

18. Chistiakov DA, Savost'anov KV, Nosikov VV. CTLA4 gene polymorphisms are associated with, and linked to, insulin-dependent diabetes mellitus in a Russian population. *BMC Genet.* 2001;2(1):6
19. Lucassen AM, Julier C, Beressi J-P, et al. Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *Nature Genet* 1993;4:305-310.
20. Stead JDH, Buard J, Todd JA, Jeffreys AJ. Influence of allele lineage on the role of the insulin minisatellite in susceptibility to type 1 diabetes. *Hum Mol Genet* 2000;9(20):2929-2935.
21. Haller K, Kisand K, Nemvalts V, Laine AP, Ilonen J, Uibo R. Type 1 diabetes is insulin -2221 MspI and CTLA-4 +49 A/G polymorphism dependent. *Eur J Clin Invest.* 2004 Aug;34(8):543-8.
22. Laine AP, Nejentsev S, Veijola R, Korpinen E, Sjoroos M, Simell O, Knip M, Akerblom HK, Ilonen J. A linkage study of 12 IDDM susceptibility loci in the Finnish population. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004 Mar-Apr;20(2):144-9.
23. Laine AP, Hermann R, Knip M, Simell O, Akerblom HK, Ilonen J. The human leukocyte antigen genotype has a modest effect on the insulin gene polymorphism-associated susceptibility to type 1 diabetes in the Finnish population. *Tissue Antigens.* 2004 Jan;63(1):72-4.
24. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000;67(2):444-461.

25. Fernandes AP, Louzada-Junior P, Foss MC, Donadi EA. HLA-DRB1, DQB1, and DQA1 allele profile in Brazilian patients with type 1 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Apr;958:305-8.
26. Volpini WM, Testa GV, Marques SB, Alves LI, Silva ME, Dib SA, Guerra G Jr, Paulino MF, Marini SH, Persoli LB, Caillat-Zucman S. Family-based association of HLA class II alleles and haplotypes with type I diabetes in Brazilians reveals some characteristics of a highly diversified population. *Hum Immunol.* 2001 Nov;62(11):1226-33.
27. Marques SB, Volpini W, Caillat-Zucman S, Lieber SR, Pavin EJ, Persoli LB. Distribution of HLA-DRB1 alleles in a mixed population with insulin-dependent diabetes mellitus from the southeast of Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1998 Mar;31(3):365-8.
28. Eizirik DL, Monteiro CM, Voltarelli JC, Foss MC. Frequency of HLA antigens in a Brazilian type I diabetic population. *Braz J Med Biol Res.* 1987;20(5):533-7.
29. Gomes MB, Ruzany F, Quadra AA, Sarno EN, Arduino F. Histocompatibility antigens and insulin-dependent diabetes: a study of 20 Brazilian families. *Braz J Med Biol Res.* 1981 Dec;14(6):379-81.
30. Soini, E and Kojola, H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates. A new generation of non-isotopic immunoassays. *Clin. Chem.* (1983): 29, 65-68
31. Hemmilä, I, Dakubu, S., Mikkala, V.-M., Siitari, H and Lövgren, T. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Anal. Biochem.* 1984 137, 335-343.

32. Kimpimaki T, Kulmala P, Savola K, Vahasalo P, Reijonen H, Ilonen J, Akerblom HK, Knip M. Disease-associated autoantibodies as surrogate markers of type 1 diabetes in young children at increased genetic risk. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Mar;85(3):1126-32
33. Turpeinen H, Laine AP, Hermann R, Simell O, Veijola R, Knip M, Ilonen J. A linkage analysis of the CTLA4 gene region in Finnish patients with type 1 diabetes. *Eur J Immunogenet.* 2003 Aug;30(4):289-93
34. Lee YJ, Lo FS, Shu SG, Wang CH, Huang CY, Liu HF, Wu CC, Yang TY, Chang JG. The promoter region of the CTLA4 gene is associated with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001 Apr;14(4):383-8
35. Bouqbis L, Izaabel H, Akhayat O, Perez-Lezaun A, Calafell F, Bertranpetit J, Comas D. Association of the CTLA4 promoter region (-1661G allele) with type 1 diabetes in the South Moroccan population. *Genes Immun.* 2003 Mar;4(2):132-7.
36. Bittencourt PL, Palacios SA, Farias AQ, Abrantes-Lemos CP, Cancado EL, Carrilho FJ, Laudanna AA, Kalil J, Goldberg AC. Analysis of major histocompatibility complex and CTLA-4 alleles in Brazilian patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003 Sep;18(9):1061-6.
37. Bittencourt PL, Palacios SA, Cancado EL, Porta G, Carrilho FJ, Laudanna A A, Kalil J, Goldberg AC. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms do not confersusceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2 in Brazil. *Am J Gastroenterol.* 2003 Jul;98(7):1616-20.

38. Djilali-Saiah I, Ouellette P, Caillat-Zucman S, Debray D, Kohn JI, Alvarez F. CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol.* 2001 Dec;62(12):1356-62.
39. Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2000 Jan;31(1):49-53.
40. Petersen JS, Karlsen AE, Markholst H, Worsaae A, Dyrberg T, Michelsen B. Neonatal tolerization with glutamic acid decarboxylase but not with bovine serum albumin delays the onset of diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 1994 Dec;43(12):1478-84.
41. Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature.* 1993 Nov 4;366(6450):69-72.
42. Bretzel RG, Eckhard M, Brendel MD. Pancreatic islet and stem cell transplantation: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Panminerva Med.* 2004 Mar;46(1):25-42. Review.

Artigo 2:

Evidência de influência genética na idade de manifestação da diabetes tipo 1 em indivíduos brasileiros.

Ferreira ACS^{1,3}, Sampaio IB², Pardini VC³, Godard ALB¹

1-Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

2-Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

3-Departamento de Genética Humana, Instituto Hermes Pardini.

O Diabetes Tipo 1 (DM1) ou insulino-dependente é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, na qual fatores genéticos e ambientais desempenham papel relevante no seu desencadeamento (Cahill et al., 1981). O DM1, afeta indivíduos geneticamente susceptíveis, tem a mesma incidência em ambos os sexos, e se manifesta clinicamente quando ocorre uma destruição significativa das células beta pancreáticas, levando a uma severa insulinopenia (Nerup et al., 1988).

Vários componentes genéticos, como alguns alelos do locus do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), polimorfismos dos genes CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 - um gene associado a regulação negativa do sistema imunológico), e insulina -2221 *Msp I* (perda de um sítio de restrição para a enzima *Msp I* na região 5' do gene da insulina, geralmente associada com predisposição genética ao diabetes), têm sido descritos como importantes no desenvolvimento da doença. Fatores ambientais principalmente relacionados à dieta, como exposição precoce ao leite de vaca, e infecção por determinados patógenos tem igual importância na patogênese da doença.

O diabetes tipo 1 manifesta-se geralmente durante a infância ou adolescência e possui uma grande variabilidade na idade de surgimento da doença, podendo se manifestar desde o primeiro ano de vida até a fase adulta (Gorsuch et al., 1981, Eisenbarth, 1986). Poucos trabalhos apontam algum tipo de associação entre componentes genéticos e idade de manifestação da doença (Valdes et al., 1999, Murao et al, 2004). Neste trabalho utilizamos a análise fatorial de componentes principais, no intuito de determinar qual a influência de alguns marcadores genéticos comprovadamente envolvidos na patogênese da DM1 e a idade de manifestação clínica da doença. Para tanto, procuramos verificar a existência de uma associação entre os alelos de risco de desenvolvimento de

DM1 dos locos de HLA DQB1, DQA1, DRB1, CTLA-4 e gene da insulina com a idade de instalação do diabetes.

A análise de componentes principais foi originalmente descrita por Person em 1901 e desenvolvida por Hotelling em 1933. Esta análise permite que um certo número de variáveis seja analisado concomitantemente. Isto torna possível verificar as relações existentes entre elas por meio de uma abordagem descritiva onde, através de um modelo gráfico, podemos observar o comportamento de cada variável em relação às demais. Havendo n variáveis haverá um espaço de n dimensões com até n eixos principais, cada um deles correspondendo a uma componente principal. Normalmente a análise é feita com as três primeiras componentes principais – a primeira contendo um maior valor de inércia e as demais definidas seqüencialmente no sentido decrescente. Juntas, devem somar mais de 70% da inércia, segundo critério citado por Sampaio (1993).

O resultado da análise pode ser observado através de um gráfico de três dimensões, correspondentes às três primeira componentes principais. A inércia define a regularidade ou constância do sistema proposto, ou seja, um valor alto de inércia mostra que a associação encontrada é constante e regular.

Pela distância euclidiana (distância entre dois pontos) e a posição nos quadrantes do gráfico podemos visualizar as relações entre as variáveis. Variáveis situadas em um mesmo quadrante e próximas entre si são fortemente associadas; variáveis situadas em quadrantes opostos são inversamente associadas. Variáveis distantes uma da outra situadas no mesmo lado, porém em quadrantes diferentes, apresentam associação fraca (Sampaio, 1993).

Em nosso trabalho, analisamos a influência dos marcadores moleculares de predisposição genética ao DM1 na idade de surgimento da doença. Para tanto, realizamos a tipagem dos alelos do locos HLA DQB1, DQA1 e DRB1*04, do polimorfismo 49 A→G do gene CTLA4 e do polimorfismo -2221 *Msp I* do gene da insulina em 49 indivíduos com diagnóstico clínico e laboratorial de diabetes tipo 1. As idades de instalação da doença nos indivíduos analisados variaram de 0,4 até 19,2 anos. Neste estudo não foi utilizado grupo controle (indivíduos sem diabetes), pois o intuito do trabalho era analisar idade de manifestação da doença.

Estes marcadores genéticos citados foram utilizados em um trabalho anterior realizado por nosso grupo (dados não publicados) no qual o objetivo foi o de determinar o risco de desenvolvimento de diabetes tipo 1 em indivíduos da população brasileira.

O DNA foi extraído de sangue periférico utilizando o kit PUREGENE® de indivíduos com diagnóstico clínico e laboratorial de diabetes tipo 1 após assinatura de um termo de consentimento informado. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética local.

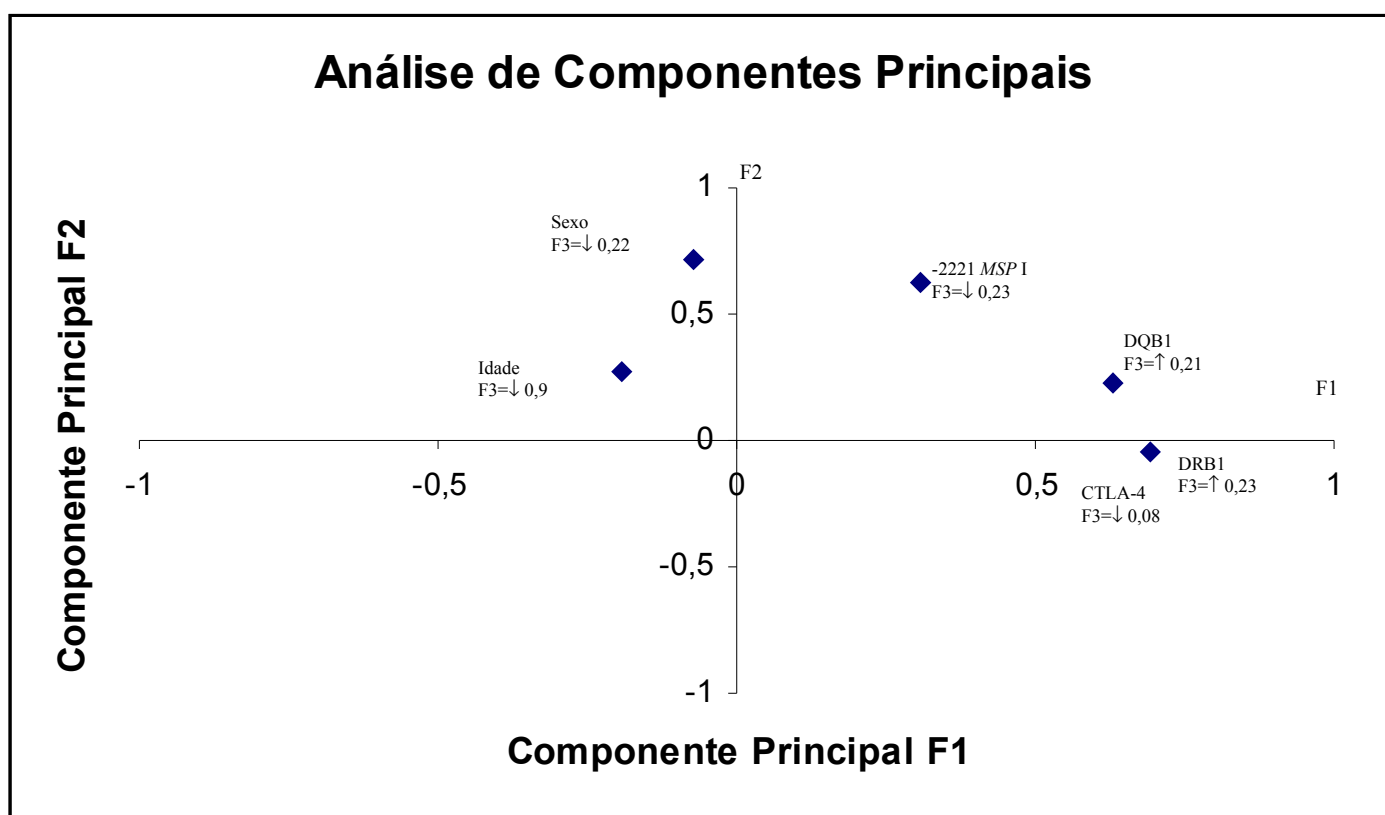
Para a detecção dos alelos foi utilizando a tecnologia DELFIA® (Walac Oy, Turku, Finlândia). Um micrograma de DNA genômico foi utilizado como substrato para reação de PCR das regiões de HLA, CTLA-4 e gene da insulina de interesse. A detecção dos alelos foi realizada no “Time-resolved fluorometer” –1420 VICTOR™ (Walac Oy, Turku, Finlândia) após hibridização com um painel de probes marcadas com quelatos de lantanídeo, Eu(III)/Sm(III) e Tb(III) e detecção fluorimétrica tempo-resolvido (Sini et al., 1983, Hemmilä et al., 1984). O software INFostat (Infostat Group, Cordoba, Argentina) foi utilizado para a análise de componentes principais. Após a tipagem dos marcadores genéticos foi verificado que todos os indivíduos apresentavam alelos de predisposição do HLA DQA1, e devido a isto este marcador foi retirado da análise.

Tabela 1. Coeficiente de correlação das variáveis estudadas (DQB1, DRB1, CTLA-4, -2221 Msp I, idade de surgimento de diabetes e sexo) com os três primeiros componentes principais (F1, F2 e F3) nos indivíduos diabéticos.

Variáveis	Componentes Principais		
	F1	F2	F3
DQB1	0,63	0,23	0,21
DRB1	0,69	-0,04	0,23
CTLA-4	0,73	-0,29	-0,08
-2221 Msp I	0,31	0,62	-0,23
Idade	-0,19	0,27	0,90
Sexo	-0,07	0,72	-0,22
Inércia explicada %	26	19	17

Na tabela 1 são apresentados os marcadores genéticos e as suas posições nos eixos formados pelas componentes principais. A representação gráfica desta tabela é mostrada no gráfico 1, onde a posição dos marcadores genéticos na terceira componente principal (F3) está demonstrada juntamente com os pontos (o símbolo \uparrow significa valores positivos e o símbolo \downarrow significa valores abaixo de zero). A leitura e interpretação do gráfico são feitas pela localização das variáveis no gráfico, verificando suas posições relativas nos quadrantes e as distâncias euclidianas entre as mesmas.

Gráfico 1: Associação entre os marcadores genéticos e sexo com idade de



surgimento de diabetes.

Através do gráfico podemos observar a existência de uma associação positiva entre os marcadores DQB1 e DRB1, pois estão situados do mesmo lado do eixo F2 com uma pequena distância entre eles, sugerindo que estes marcadores se manifestam conjuntamente nos indivíduos diabéticos. Este fato já foi observado em vários estudos que mostraram a existência de um desequilíbrio

de ligação entre DQB1-DQA1-DRB1 e DT1, caracterizando haplótipos fortemente associados à predisposição genética ao diabetes tipo 1 (Lambert et al., 2004, Herman et al., 2003, Raum et al., 1984). Volpini (2001) identificou dois haplótipos DQB1-DQA1-DRB1 que conferiam alto risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 1 e que estavam presentes na maioria dos diabéticos estudados na população brasileira.

Nesse mesmo gráfico, podemos verificar que o alelo de predisposição genética ao DM1 caracterizado pela perda do sítio de restrição da enzima *Msp I* na posição 2221 na 5' do gene da insulina (-2221 *Msp I*), está fracamente associado a idade de surgimento de diabetes. Podemos observar que, pacientes com o alelo de predisposição deste marcador tendem a desenvolver o diabetes tipo 1 mais tardiamente que pacientes que não o possuem. A associação entre a região 5' do gene da insulina e idade de manifestação tardia de diabetes já foi previamente descrita por Matejkova-Behanova e colaboradores, em 2004. Estes autores evidenciaram uma associação entre outro polimorfismo ligado ao gene de insulina (INS VNTR) e o anticorpos anti GAD em diabéticos com manifestação tardia da doença.

Em nosso trabalho, o marcador genético com maior associação com a idade de surgimento de diabetes tipo 1 foi o alelo de risco caracterizado pela transição de uma adenina por uma guanina na posição 49 do primeiro exon do gene CTLA-4 (49 A→G). Podemos observar uma forte associação negativa entre o marcador CTLA-4 e a idade de surgimento de diabetes, pois os dois marcadores estão situados em quadrantes opostos no gráfico, sugerindo que indivíduos que possuem o alelo de predisposição para este marcador tendem a desenvolver diabetes mais precocemente.

A associação entre o polimorfismo 49 A→G do gene CTLA-4 e a idade precoce de manifestação da doença pode ser explicada pela importância desta molécula no sistema imunológico. O gene CTLA-4 codifica uma molécula que funciona como um modulador negativo das reações imunológicas mediadas por células T. Seu produto gênico está envolvido no controle da proliferação de células T e na apoptose mediada por esta célula. Alterações neste gene podem gerar uma

perda da função reguladora do sistema imunológico, ocasionando um descontrole das reações imunológicas e propiciando o aparecimento de doenças autoimunes desde os primeiros dias de vida.

Dados da literatura mostram que alterações no gene CTLA-4 estão associadas não só com diabetes tipo 1, mas também com outras doenças autoimunes como doença de Graves, lupus eritematoso e asma. (Lee et. al. 2005, Belou et. al. 2005, Iwana et. al. 2005).

Nós obtivemos uma inércia total de 62,0 % para a análise de componentes principais que, apesar de estar abaixo do proposto por Sampaio (1993), pode ser usadas para considerar a proposta de associação entre o alelo de predisposição do gene CTLA-4 e idade precoce de surgimento do DT1 conclusiva. A associação entre idade de surgimento de diabetes tipo 1 e marcadores genéticos só foi possível pela análise de componentes principais, a qual permitiu que todas as variáveis fossem analisadas concomitantemente.

Utilizando o método de Qui-quadrado, não é possível analisar a idade de manifestação da doença com todos os marcadores genéticos ao mesmo tempo, pois este método somente realiza uma análise de comparação entre dois grupos (pacientes e controles) onde a resposta de interesse é dicotômica (Jekel et al. 1999).

Os dados aqui obtidos não se aplicam para análise de predisposição genética ao diabetes tipo 1 uma vez que todos os indivíduos analisados são clinicamente portadores da doença. Entretanto, ele nos fornece ferramentas para o acompanhamento de indivíduos geneticamente predispostos, uma vez que, dependendo dos marcadores de predisposição encontrados, podemos não só determinar qual a chance deles desenvolverem diabetes, mas também determinar o período mais provável de suas vidas no qual a doença irá se instalar. Essa informação é, sem dúvida alguma, de grande importância na determinação do início de um possível tratamento preventivo.

A partir dos dados aqui obtidos, sugerimos que as análises dos marcadores genéticos 49 A→G do gene CTLA-4 e -2221 *Msp* I, que associados a idade de manifestação de diabetes, devam ser incluídas nos estudos de

predisposição genética a doença, juntamente com os marcadores HLA DQB1 e HLA DQA1 em indivíduos da população brasileira.

Bibliografia:

1. Belou A, Finn PW. Costimulation: Critical Pathways in the Immunologic Regulation of Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005 Mar;5(2):149-154
2. Cahill G.F., Florin-Christiansen A., Doniach.D. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* n.304, p.1454-1465, 1981.
3. Eisenbarth G.S. Type 1 diabetes mellitus: a chronic auto-immune disease. *N Engl. J. Med.* n.314, p.1360-1368, 1986.
4. Gorsuch A.N., Spencer K.M., Lister J., McNally J.M., Dean B.M., Botazzo G.F. Evidence of a long prediabetic period in type 1 diabetes mellitus. *Lancet* n.2, p.1363-1364, 1981
5. Hemmilä, I, Dakubu, S., Mukkala, V.-M., Siitari, H and Lövgren, T. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Anal. Biochem.* 1984 137, 335-343.
6. Hermann R, Turpeinen H, Laine AP, Veijola R, Knip M, Simell O, Sipila I, Akerblom HK, Ilonen J. HLA DR-DQ-encoded genetic determinants of childhood-onset type 1 diabetes in Finland: an analysis of 622 nuclear families. *Tissue Antigens.* 2003 Aug;62(2):162-9.
7. Hotelling, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of educational psychology*, n 24, p417-441, 498-520, 1933.
8. Iwana S, Ikezaki A, Kikuoka N, Kim HS, Matsuoka H, Yanagawa T, Sato H, Hoshi M, Sakamaki T, Sugihara S. Association of HLA-DR, -DQ Genotype and CTLA-4 Gene Polymorphism with Graves' Disease in Japanese Children. *Horm Res.* 2005 Jan 3;63(2):55-60.
9. Jekel, J.F., Elmore J. G., Katz D. L., *Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva.* Porto alegre: Artes médicas Sul, p.328, 1999.

10. Lambert AP, Gillespie KM, Thomson G, Cordell HJ, Todd JA, Gale EA, Bingley PJ. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Aug;89(8):4037-43.
11. Lee YH, Harley JB, Nath SK. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet.* 2005 Feb 2; [Epub ahead of print]
12. Matejkova-Behanova M, Vankova M, Hill M, Kucera P, Cinek O, Andel M, Bendlova B. Polymorphism of INS VNTR is associated with glutamic acid decarboxylase antibodies and postprandial C-peptide in patients with onset of diabetes after 35 years of age. *Physiol Res.* 2004;53(2):187-90.
13. Murao S, Makino H, Kaino Y, Konoue E, Ohashi J, Kida K, Fujii Y, Shimizu I, Kawasaki E, Fujiyama M, Kondo S, Tanaka K, Tarumi Y, Seto I, Kato K, Ohno K, Kusunoki Y, Ebisui O, Takada Y, Tanabe K, Takemoto K, Onuma H, Nishimiya T, Osawa H. Differences in the contribution of HLA-DR and -DQ haplotypes to susceptibility to adult- and childhood-onset type 1 diabetes in Japanese patients. *Diabetes.* 2004 Oct;53(10):2684-90.
14. Nerup J., Mandrup-Poulsen T., Molvig J., Helqvist S., Wogensen L., Egberg J. Mechanisms of pancreatic β destruction in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1988. n.11, p 16-23,
15. Person, K., On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine.* 1901 n.6(2), p559-572.
16. Raum D, Awdeh Z, Yunis EJ, Alper CA, Gabbay KH. Extended major histocompatibility complex haplotypes in type I diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1984 Aug;74(2):449-54.
17. Sampaio, I. Relatório das atividades de pós doutorado desenvolvidas no período de 03/09/92 a 04/03/93. Madrid: Universidade politécnica de Madrid, 1993, 123f.
18. Soini, E and Kojola, H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates. A new generation of non-isotopic immunoassays. *Clin. Chem.* (1983): 29, 65-68.

19. Valdes AM, Thomson G, Erlich HA, Noble JA. Association between type 1 diabetes age of onset and HLA among sibling pairs. *Diabetes*. 1999 Aug;48(8):1658-61.
20. Volpini WM, Testa GV, Marques SB, Alves LI, Silva ME, Dib SA, Guerra G Jr, Paulino MF, Marini SH, Persoli LB, Caillat-Zucman S. Family-based association of HLA class II alleles and haplotypes with type I diabetes in Brazilians reveals some characteristics of a highly diversified population. *Hum Immunol*. 2001 Nov;62(11):1226-33.

Conclusão:

Recentemente vários tratamentos para DM1 surgiram baseados em tolerização oral ou venosa. Alguns grupos de trabalho como o DPT-1 (Diabetes Prevention Trial) e o European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT)

tentam, através de tolerização com alguns peptídeos, inibir ou retardar o surgimento de diabetes em indivíduos geneticamente predispostos. (Schatz et al. 2001). Um dos principais pontos neste tipo de trabalho é a correta identificação dos indivíduos geneticamente predispostos na população submetida ao tratamento.

Em populações heterogêneas como a brasileira, estudos de associação entre marcadores genéticos e predisposição a doença se fazem cada vez mais necessários tendo em vista que, devido ao alto polimorfismo dos marcadores genéticos estudados, cada população estudada mostra um perfil de associação diferente.

Em nosso trabalho, analisamos não só a predisposição genética ao DM1, mas também como esses fatores genéticos podem influenciar na idade de surgimento da doença.

Utilizando o método de Woolf encontramos resultados de predisposição genética semelhantes ao de outras populações analisadas (Artigo 1). A análise dos alelos do locus HLA confirmou a importância dos alelos DQB1*02, DQB1*0302 e DQA1*03 na predisposição ao DM1. Também observamos a importância de DQB1*0301 na proteção contra o desenvolvimento da doença. Estes resultados já foram encontrados em outras populações do mundo e também na população brasileira (Volpini et al., 2001)

Surpreendentemente o polimorfismo 49A→G do gene CTLA-4, assim como o polimorfismo -2221 *Msp* I do gene da insulina não se mostraram importantes na predisposição genética ao diabetes tipo 1.

Utilizamos também uma análise fatorial discriminante com o intuito de estabelecer qual ou quais dos marcadores seriam mais importantes para distinguir indivíduos diabéticos e não diabéticos analisando apenas os resultados das tipagens dos marcadores genéticos utilizados.

Esta análise revelou que os alelos de predisposição do locus HLA DQA1 tem o maior poder de discriminação entre os marcadores analisados, conseguindo caracterizar sozinho 71,3% dos indivíduos entre diabéticos e não diabéticos. Junto com os alelos de predisposição do locus HLA DQB1 este poder de discriminação

sobe para 82,47%. Os outros marcadores analisados não incrementaram em nada o poder de discriminação da análise. Este tipo de análise se mostra de grande valia uma vez que podemos extrapolar para a população geral, ou seja, utilizando apenas os dois marcadores de maior poder de discriminação, conseguimos identificar, com um certo grau de certeza (82,47%), indivíduos diabéticos ou geneticamente predispostos ao diabetes tipo 1.

Na segunda etapa do nosso trabalho, mostrada no artigo 2, utilizamos a análise de componentes principais com o intuito de estabelecer se os marcadores genéticos de predisposição ao diabetes tipo 1 influenciavam na idade de manifestação da doença. Nesse trabalho, analisamos a influência dos alelos de HLA DQB1, DQA1 e DRB1*04, dos polimorfismos 49 A→G do gene CTLA4, -2221 *Msp I* do gene da insulina, além do sexo dos indivíduos e da idade de surgimento de diabetes tipo 1 em 49 indivíduos com diagnóstico clínico e laboratorial de diabetes tipo 1. As idades de diagnóstico da doença variaram de 0,4 até 19,2 anos.

A análise de componentes principais permite que um certo número de variáveis seja analisado concomitantemente. Isto torna possível verificar a existência de relações entre elas por meio de uma abordagem descritiva onde, através de um modelo gráfico, podemos observar o comportamento de cada variável em relação às demais.

Através desta análise, foi possível observar que alguns marcadores genéticos influenciam na idade de manifestação da doença. Indivíduos que possuem o alelo G (guanina) do polimorfismo 49 A→G do gene CTLA-4 desenvolvem diabetes mais precocemente do aqueles que não possuem este alelo. A associação entre este polimorfismo e a idade precoce de manifestação da doença ainda não tinha sido demonstrada em nenhuma outra população. Também encontramos uma associação fraca entre o polimorfismo -2221 *Msp I* do gene da insulina e idade tardia de manifestação da doença.

A associação entre o polimorfismo 49 A→G do gene CTLA-4 e idade precoce de manifestação da doença, pode ser explicada pela importância desta molécula no sistema imunológico. O gene CTLA-4 codifica uma molécula que funciona

como um modulador negativo das reações imunológicas mediadas por células T. Sendo assim, alterações neste gene podem ocasionar mal funcionamento dos processos imunológicos propiciando o surgimento de doenças autoimunes desde os primeiros dias de vida. Dados da literatura mostram que alterações no gene CTLA-4 estão associadas não só com o diabetes tipo 1, mas também com outras doenças auto-imunes como a doença de Graves, lupus eritematoso e asma (Lee et. al. 2005, Belou et. al. 2005, Iwana et. al. 2005).

Baseados em nossos resultados podemos concluir que utilizando os marcadores genéticos aqui descritos e as ferramentas de análises estatísticas apropriadas não só é possível estabelecer o risco de desenvolvimento da doença, mas também de se ter uma indicação da idade mais provável de surgimento da mesma.

Assim sendo, nosso trabalho conseguiu apresentar dados importantes não só para a identificação correta dos indivíduos geneticamente predispostos ao DM1 mas também conseguimos indicar nestes indivíduos predispostos, qual a provável idade que a doença pode se manifestar.

Acreditamos que esta correta identificação dos indivíduos predispostos ao DM1, assim como a determinação da provável idade de manifestação da doença, será de extrema importância na indicação das novas terapias que estão surgindo, evoluindo tolerização oral e venosa e terapia celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Abe T, Yamaguchi Y, Takino H, Fujita N, Yamauchi-Degawa M, Ozaki M, Yamakawa K, Sera Y, Sakamaki H, Uotani S, Kawasaki E, Awata T, Yamasaki H, Eguchi K. CTLA4 gene polymorphism contributes to the mode of onset of diabetes with antiglutamic acid decarboxylase antibody in Japanese patients:

- genetic analysis of diabetic patients with antiglutamic acid decarboxylase antibody. *Diabet Med.* 18(9), p.726-731, 2001.
2. Abu-Bakare A, Taylor R, Gill GV, Alberti KGMM. Tropical or malnutrition related diabetes: a real syndrome? *Lancet* 1986; p.1135-1138.
 3. Anjos S, Polychronakos C. Mechanisms of genetic susceptibility to type 1 diabetes: beyond HLA. *Mol Genet Metab.* 2004 Mar;81(3):187-95. Review.
 4. Anjos SM, Tessier MC, Polychronakos C. Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Dec;89(12):6257-65.
 5. Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. Diabetes in identical twins. *Diabetologia* 1981. n.20, p. 87-93.
 6. Belou A, Finn PW. Costimulation: Critical Pathways in the Immunologic Regulation of Asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005 Mar;5(2):149-154
 7. Bennett S.T., Todd J.A. Human type 1 diabetes and the insulin gene: Principles of mapping polygenes. *Annu. Ver Gent.* n.30, p.343-70, 1996.
 8. Boggio R, Colombo R, Hay RT, Draetta GF, Chiocca S. A mechanism for inhibiting the SUMO pathway. *Mol Cell.* 2004 Nov 19;16(4):549-61.
 9. Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D. A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 2004 Jun 25;279(26):27233-8. Epub 2004 Apr 29.
 10. Bouchardat A. De la Glycosurie au Diabète Sucre: Son Traitement Hygiénique. Paris: Germer-Ballière, 1875.
 11. Butt RK, Oyama Y, Traynor A, Kenyon NS. Hematopoietic stem cell therapy for type 1 diabetes: induction of tolerance and islet cell neogenesis. *Autoimmun Rev.* 2002 May;1(3):133-8. Review.
 12. Buzzeti R., Quattrocchi C.C., Nistico L. Dissecting the genetics of type 1 diabetes: Relevance for familial clustering and differences in incidence. *Diabetes Metab Rev* n.14, p.111-128, 1998.

13. Cahill G.F., Florin-Christiansen A., Doniach D. Islet cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* n.304, p.1454-1465, 1981.
14. Catargi B, Rigalleau V, Poussin A, Ronci-Chaix N, Bex V, Vergnot V, Gin H, Roger P, Tabarin A. Occult Cushing's syndrome in type-2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Dec;88(12):5808-13.
15. Colagiuri S., Leong G.M., Thayer Z., Antony G., Dwyer J.M., Kidson W., Wakefield D. Intravenous immunoglobulin therapy for autoimmune diabetes mellitus. *Clin Exp Rheum.* n14(15), p.93-97, 1996.
16. Donner H., Seidl C., Brau J., Siegmund T., Herwig J., Seifried E., Usadel K.H., Badenhop K. CTL4 gene haplotypes cannot protect from IDDM in the presence of high-risk HLA DQ8 or DQ2 alleles in German families. *Diabetes* n.47, p.1158-1160, 1998.
17. Douek IF, Gillespie KM, Bingley PJ, Gale EA. Diabetes in the parents of children with Type I diabetes. *Diabetologia.* 2002 Apr;45(4):495-501.
18. Eisenbarth G.S. Type 1 diabetes mellitus: a chronic auto-immune disease. *N Engl. J. Med.* n.314, p.1360-1368, 1986.
19. Eizirik DL, Monteiro CM, Voltarelli JC, Foss MC. Frequency of HLA antigens in a Brazilian type I diabetic population. *Braz J Med Biol Res.* 1987;20(5):533-7.
20. Endreffy E, Laszlo, Szabo A, Roman F, Kurti K, Kalman M, Rasko I. Molecular genetic studies in monogenic and polygenic human diseases. *Acta Biol Hung.* 1997;48(1):121-8.
21. Esposito L., Hill N.J., Pritchard L.E., Cucca F., Muxworthy C., Merriman M.E., Wilson A., Julier C., Delepine M., Tuomilehto J., Tuomilehto-Wolf E. Ionesco-Tirgoviste C., Nistico L., Buzzetti R., Pozzilli P., Ferrarini M., Boschi E., Pociot F., Nerup J., Bain S.C., Todd J.A. Analysis of putative loci IDDM7, IDDM12, and IDDM13 and candidate genes NRAMP1 and IA-2 and the interleukin-1 gene cluster. *Diabetes* n.47, p.1797-1799, 1998.
22. Fajans SS. MODY- a model for understanding the pathogenesis and natural history of type 2 diabetes. *Hormone Metabol Res.* 1987 n.19, p.591-599.

23. Fajardy I, Vambergue A, Stuckens C, Weill J, Danze PM, Fontaine P. CTLA-4 49 A/G dimorphism and type 1 diabetes susceptibility: a French case-control study and segregation analysis. Evidence of a maternal effect. *Eur J Immunogenet.* 29(3), p. 251-257, 2002.
24. Foster, DW & Wilson, JD Williams: Tratado de Endocrinologia. 1988 7°ed. V.2, p1259-1335.
25. Gomes KB, Fernandes AP, Ferreira AC, Pardini H, Garg A, Magre J, Pardini VC. Mutations in the seipin and AGPAT2 genes clustering in consanguineous families with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy from two separate geographical regions of Brazil. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jan;89(1):357-61.
26. Gorsuch A.N., Spencer K.M., Lister J., McNally J.M., Dean B.M., Botazzo G.F. Evidence of a long prediabetic period in type 1 diabetes mellitus. *Lancet* n.2, p.1363-1364, 1981.
27. Gottlieb MS, Root HF. Diabetes mellitus in twina. *Diabetes* 1968. n.17, p.693-704.
28. Greenspan FS, Baxter J.D. Basic and clinical endocrinology. 4.ed. Lange Medical Book, 1994.
29. Haller K, Kisand K, Nemvalts V, Laine AP, Ilonen J, Uibo R. Type 1 diabetes is insulin -2221 MspI and CTLA-4 +49 A/G polymorphism dependent. *Eur J Clin Invest.* 2004 Aug;34(8):543-8
30. Heit JJ, Kim SK. Embryonic stem cells and islet replacement in diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes.* 2004;5 Suppl 2:5-15.
31. Hotelling, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of educational psychology*, n 24, p417-441, 498-520, 1933.
32. Iwana S, Ikezaki A, Kikuoka N, Kim HS, Matsuoka H, Yanagawa T, Sato H, Hoshi M, Sakamaki T, Sugihara S. Association of HLA-DR, -DQ Genotype and CTLA-4 Gene Polymorphism with Graves' Disease in Japanese Children. *Horm Res.* 2005 Jan 3;63(2):55-60
33. Jones DB, Coulson AF, Duff GW. Sequence homologies between hsp60 and autoantigens. *Immunol Today.* 1993 Mar;14(3):115-8.

34. Juedes AE, Rodrigo E, Togher L, Glimcher LH, von Herrath MG. T-bet controls autoaggressive CD8 lymphocyte responses in type 1 diabetes. *J Exp Med*. 2004 Apr 19;199(8):1153-62.
35. Karounos D.G., Bryson J.S., Cohen D.A. Metabolically inactive insulin analog prevents type 1 diabetes in prediabetic NOD mice. *J Clin Invest* n.6(100), p.1344-1348, 1997.
36. Karounos D.G., Bryson J.S., Cohen D.A. Metabolically inactive insulin analog prevents type 1 diabetes in prediabetic NOD mice. *J. Clin. Invest* n.6(100), p. 1344-1348, 1997.
37. Karvonen M., Tuomiheto J., Libman A., La Porte R. A review of recent epidemiological data on the world wide incidence of type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* n.36, p.883-892, 1993.
38. Kawai S., Maekawajir S., Yamane A A simple method of detecting amplified DNA with immobilized probes on microtiter wells. *Analytical Biochemistry* n. 209, p. 63-69, 1993.
39. Keller R.J., Eisenbarth G.S., Jackson R.A. Insulin prophylaxis in individuals at high risk of type I diabetes. *Lancet* n.341, p.927-928, 1993.
40. Khalil I., d'Aurio L., Gobet M., Morin L., Lepage V., Deschamps I., Park MS., Degos L., Galibert F., Hors J. A combination of HLA-DQ beta Asp 57-negative and HLA-DQ alpha Arg-52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*n.85, p.1315-1319, 1990.
41. Kozak GP, Cooppan R. Diabetes and other endocrinology disorders. In: Marble A., ed. *Joslin's diabetes mellitus*, 12 th edn. Philadelphia: Lea and Febinger, 1985: p.785-816.
42. Landon MB, Gabbe FJ. Diabetes mellitus and pregnancy. *Obstet. Gynecol. Clin North Am*. 1992 n. 19, p.663
43. Lee YH, Harley JB, Nath SK. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet*. 2005 Feb 2;
44. Leiter EH, 1997. The NOD Mouse A Model for Insulin-Dependent Diabetes
45. Marques J.M., Goldberg A.C., Abel L. Carvalho E.M., Kalil J., Dessein A. Distribution of HLA-DRB1 alleles in a mixed population with insulin-dependent

- diabetes mellitus from the southeast of Brazil. *Braz J Med Biol Res.* n.31(3), p.365-368, 1998
46. Marrom M.P., Raffel L.J., Garchon H.J., Jacob C.O., Serrano-Rios M., Martinez L.M., Teng W.P., Park Y., Zhang Z.X., Goldstein D. R., Tao Y.W., Beaurain G., Bach J.F., Huang H.S., Luo D.F., Zeidler A., Rotter J.I., Yang M.C., Modilevsky T., Maclaren N.K., She J.X. Insulin-dependent diabetes mellitus (DDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* n. 6, p.1275-1282, 1997.
 47. Mather HM, Keen H. The Southall Diabetes Survey: prevalence of know diabetes in Asians and Europeans. *Br. Med J* n 291, p1081-1084, 1985.
 48. Mein C.A, Esposito L., Dunn M.G., Johnson G.C., Timms A.E., Goy J.V., Smith A.N., Sebag-Montefiore L., Merriman M.E., Cucca F., Todd J.A. A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nat Genet.* n.19(3),p.297-300,1998.
 49. Murao S, Makino H, Kaino Y, Konoue E, Ohashi J, Kida K, Fujii Y, Shimizu I, Kawasaki E, Fujiyama M, Kondo S, Tanaka K, Tarumi Y, Seto I, Kato K, Ohno K, Kusunoki Y, Ebisui O, Takada Y, Tanabe K, Takemoto K, Onuma H, Nishimiya T, Osawa H. Differences in the contribution of HLA-DR and -DQ haplotypes to susceptibility to adult- and childhood-onset type 1 diabetes in Japanese patients. *Diabetes.* 2004 Oct;53(10):2684-90.
 50. Nerup J., Mandrup-Poulsen T., Molvig J., Helqvist S., Wogensen L., Egberg J. Mechanisms of pancreatic β destruction in type 1 diabetes. *Diabetes Care* n.11, p 16-23, 1988.
 51. Owerbach D., Gabbay K.H. Localization of type 1 diabetes susceptibility locus to the variable tandem repeat region flanking the insulin gene. *Diabetes* n.42 p.1708-1714, 1993.
 52. Pardini V.C., Mourão D.M., Nascimento P.D., Vilolo M.A, Ferreira S.R., Pardini H. Frequency of islet cell antibodies (IA-2 and GAD) in young Brazilian type 1 diabetes patients. *Braz J Med Bol Res.*n.32(10), p.1195-1198, 1999.
 53. Person, K., On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine* n.6(2), p559-572.

54. Petersen J.S., Karlsen A.E., Markholst h., Worsaae A., Dyrberg T., Michelsen B. Neonatal tolerization with glutamic acid decarboxylase but not with bovine serum albumin delays the onset of diabetes in NOD mice. *Diabetes*. n.43(12), p.1474-1484, 1994.
55. Pickup J, Williams G. Textbook of diabetes. 1 ed. Vol1. Blackwell Scientific Publications, 1991.
56. Pitkaniemi J, Hakulinen T, Nasanen J, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J; DiMe Study Group. Class I and II HLA genes are associated with susceptibility and age at onset in Finnish families with type 1 diabetes. *Hum Hered*. 2004;57(2):69-79.
57. Rewers A, Babu S, Wang TB, Bugawan TL, Barriga K, Eisenbarth GS, Erlich HA. Ethnic differences in the associations between the HLA-DRB1*04 subtypes and type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Nov;1005:301-9.
58. Rewers M, Norris J, Dabelea D. Epidemiology of type 1 Diabetes Mellitus. *Adv Exp Med Biol*. 2004;552:219-46. Review.
59. Rolandson O, Hagg E, Janer M, Rutledge E, Gaur LK, Nilsson M, Hallmans G, Lernmark A. High GAD65 autoantibody levels in nondiabetic adults are associated with HLA but not with CTLA-4 or INS VNTR. *J Intern Med*. 2003 Apr;253(4):447-53.
60. Sasaki Y, Ihara K, Matsuura N, Kohno H, Nagafuchi S, Kuromaru R, Kusuhara K, Takeya R, Hoey T, Sumimoto H, Hara T. Identification of a novel type 1 diabetes susceptibility gene, T-bet. *Hum Genet*. 2004 Aug;115(3):177-84. Epub 2004 Jul 06.
61. Schatz DA, Bingley PJ. Update on major trials for the prevention of type 1 diabetes mellitus: the American Diabetes Prevention Trial (DPT-1) and the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2001;14 Suppl 1:619-22.
62. Serjeantson SW, Owerbach D, Zimmet P, Nerup J, Thomas K. Genetics of diabetes in Nauru: effects of foreign admixture, HLA antigens and insulin gene linked polymorphism. *Diabetologia* 1983; n.25, p.13-17.

63. Starkman H, Das S. Cystic fibrosis presenting as new onset diabetes mellitus in adolescent twins. *Pediatr Diabetes*. 2004 Jun;5(2):99-101.
64. Stead JD, Buard J, Todd JA, Jeffreys AJ. Influence of allele lineage on the role of the insulin minisatellite in susceptibility to type 1 diabetes. *Hum Mol Genet*. 12;9(20), p. 2929-2935, 2000
65. Tattersal RB. Mild Familial Diabetes With dominant inheritance. *Q J Med*. 1974 n.70.p.339-357.
66. Thai A., Eisenbarth G.S. Natural history of IDDM. *Diabetes Reviews*. n.1(1), p.1-14, 1993.
67. Thorby E. The human major histocompatibility system. *Transplant Rev*. 1974;18:51-129.
68. Todd J.A., Genetic Control of Autoimmunity in type 1 Diabetes. *Immunology Today* 1990.n.11, p.122-129,
69. Valdes AM, Thomson G, Erlich HA, Noble JA. Association between type 1 diabetes age of onset and HLA among sibling pairs. *Diabetes*. 1999 Aug;48(8):1658-1661.
70. Volpini WM, Testa GV, Marques SB, Alves LI, Silva ME, Dib SA, Guerra G Jr, Paulino MF, Marini SH, Persoli LB, Caillat-Zucman S. Family-based association of HLA class II alleles and haplotypes with type I diabetes in Brazilians reveals some characteristics of a highly diversified population. *Hum Immunol*. 2001 Nov;62(11):1226-33.
71. Wilson DM, Buckingham B. Prevention of type 1a diabetes mellitus*. *Pediatr*
72. Winter WE, Maclaren NK, Riley W, Clarke DW, Kappy MS, Spillar RP. Maturity-onset diabetes of young in black americans. *N Engl J Med* 1987; n 316, p.285-291.
73. Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955;19:251–253.
74. Zalzman M, Gupta S, Giri RK, Berkovich I, Sappal BS, Karnieli O, Zern MA, Fleischer N, Efrat S. Reversal of hyperglycemia in mice by using human expandable insulin-producing cells differentiated from fetal liver progenitor

cells.Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 10;100(12):7253-8. Epub 2003 May 19.

75. Zimmet P, Taylor R, Ram P, *et al.* Epidemiology of diabetes and its macrovascular manifestation in pacific populations: The medical effects of social progress. Diabetes Care 1979, n 2, p. 144-153.

Anexo 1 – Modelo do termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Determinação de predisposição genética ao Diabetes Mellitus Tipo 1

O Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) ou insulino-dependente é uma doença autoimune de etiologia desconhecida, na qual fatores genéticos e ambientais desempenham papel relevante no seu desencadeamento. O DM1 afeta indivíduos geneticamente susceptíveis e se manifesta clinicamente quando ocorre uma destruição significativa das células beta

pancreáticas, levando a uma severa insulinopenia. Todas as conseqüências clínicas do DM1 se manifestam em decorrência à hiperglicemia ocasionada pela deficiência de insulina

Por consistir em um distúrbio de caráter hereditário, este trabalho tem como objetivos: (a) analisar o comportamento de marcadores genéticos de predisposição ao DM1 em indivíduos afetados e não afetados da população brasileira.; (b) Determinar o risco relativo de desenvolvimento da doença baseado na freqüência dos marcadores nos indivíduos diabéticos e não diabéticos.

Fica garantido a todos o sigilo sobre os dados clínicos e laboratoriais, e a proteção de sua identidade em caso de publicação na imprensa científica.

A coordenadoras do projeto é a Profa. Dra. ANA LÚCIA BRUNIALTI GODARD e será desenvolvido no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Todo o material biológico, após a extração de DNA, será descartado segundo normas da Vigilância Sanitária.

Eu, _____, concordo em participar do trabalho “Determinação de predisposição genética ao Diabetes Mellitus Tipo 1. Eu concordo com a coleta de sangue em mim ou em membros da minha família para o estudo acima citado. Assinatura:

Data: ___ / ___ / ___

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)