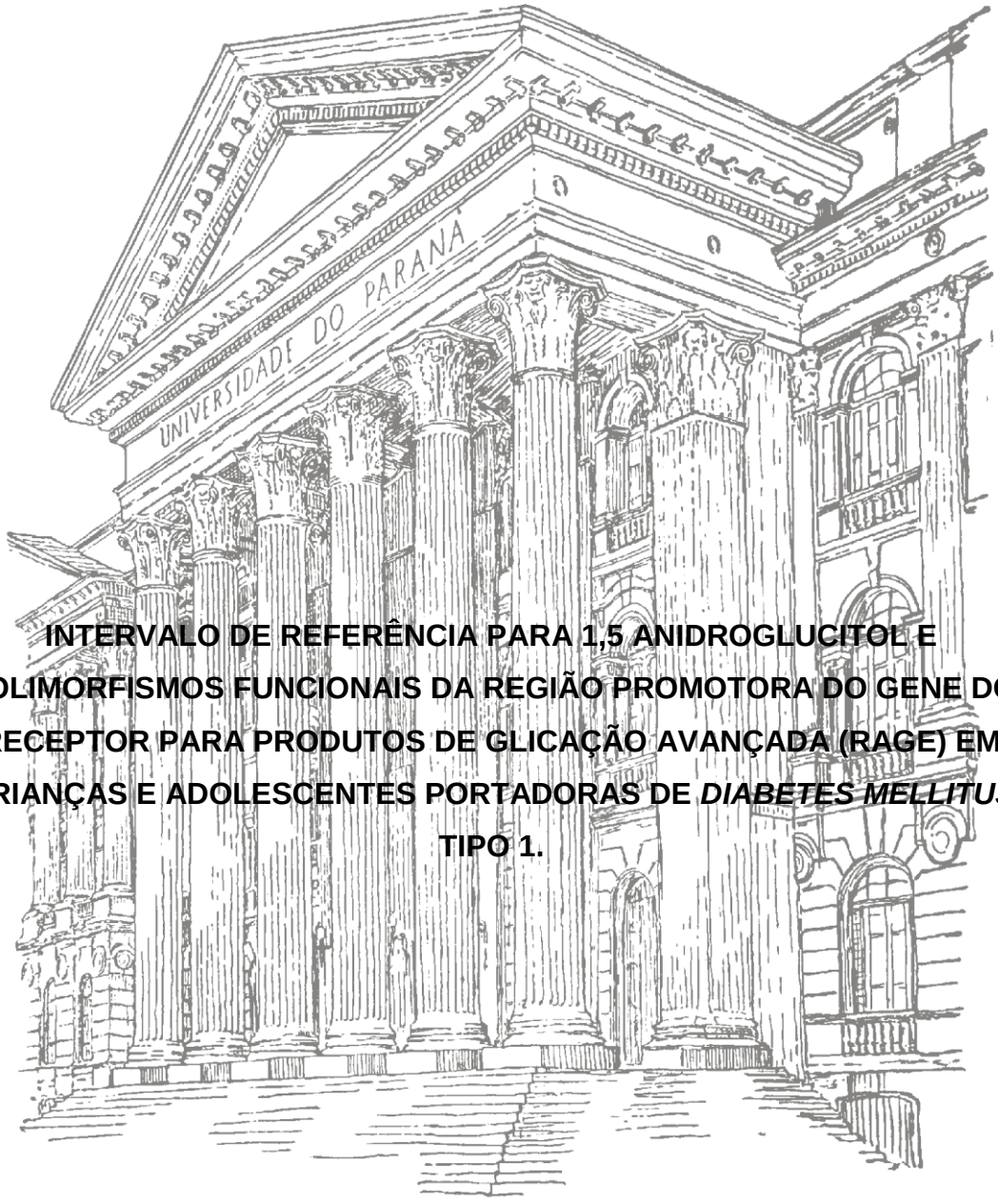
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA CARNEIRO GOMES



INTERVALO DE REFERÊNCIA PARA 1,5 ANIDROGLUCITOL E POLIMORFISMOS FUNCIONAIS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR PARA PRODUTOS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES PORTADORAS DE *DIABETES MELLITUS* TIPO 1.

CURITIBA

2015

LETÍCIA CARNEIRO GOMES

Intervalo de referência para 1,5 anidroglucitol e polimorfismos funcionais da região promotora do gene do receptor para produtos de glicação avançada (RAGE) em crianças e adolescentes portadores de *Diabetes mellitus* tipo 1

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em ciência farmacêuticas como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas, à conclusão do curso, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:Prof[a]Dr[a] Fabiane Gomes de M.Rego
Co-Orientadores: Prof[a] Dr[a] Suzana Nesi França
Prof Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2015

Gomes, Letícia Carneiro
Intervalo de referência para 1,5 anidroglucitol e polimorfismos funcionais da região promotora do gene do receptor para produtos de glicação avançada (RAGE) em crianças e adolescentes portadores *Diabetes mellitus* tipo 1 / Letícia Carneiro Gomes – Curitiba, 2015.
109 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Fabiane Gomes de M. Rego
Coorientadora: Professora Dra. Suzana Nesi França
Coorientador: Professor Dr. Geraldo Picheth
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. *Diabetes* tipo 1. 2. 1,5 AG. 3. -429T>C. 4. -374T>A. 5. 63 Pb Del. I. Rego, Fabiane Gomes de M. II. França, Suzana Nesi. III. Picheth, Geraldo. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 616.462

TERMO DE APROVAÇÃO

LETÍCIA CARNEIRO GOMES

Título: **"Intervalo de referência para 1,5 anidroglucitol e polimorfismos funcionais da região promotora do gene do receptor para produtos de glicação avançada (RAGE) em crianças e adolescentes portadoras de *Diabetes mellitus* tipo 1"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.

Profª. Drª. Fabiane Gomes de Moraes Rego
Orientadora

Profª. Drª. Suzana Nesi França
Co-orientadora

Drª. Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss
Universidade Federal do Paraná

Profª. Drª. Yanna Dantas Rattmann
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 29 de abril de 2015.

AGRADECIMENTOS

*A Deus, em primeiro lugar,*por ter me dado forças para lutar e alcançar meus objetivos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Gomes e meu co-orientador Prof. Dr. Geraldo Picheth, pelas orientações, sugestões, correções eensinamentos, por me apoiarem nas eventuais dificuldades e incertezas, mostrando soluções

A minha co-orientadora Profa Dra Suzana Nesi França pelo apoio para obtenção das amostras e sugestão para que a pesquisa fosse realizada.

Aos colegas do grupo de pesquisa em doenças metabólicas pela amizade e apoio, pela ajuda para obtenção de amostras e processamento.

A Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss, pelos ensinamentos e paciência e ajuda com os experimentos.

A Lícia Lembruger,medica residente de Unidade de Endocrinologia Pediatrica do Hospital de Clínicas, pela paciência e ajuda na coleta, as enfermeiras do HC pela realização das coletas.

Ao Prof Dr Railson Hennenberg e Profa Dra Aline Hauser, pela ajuda com a coleta de amostras nas escolas de Curitiba.

Aos meus pais Eliane e Vorner, peloapoio, incentivo e confiança no meu trabalho, pelo apoio incondicional.

Aos amigos e familiares que me incentivaram.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

O *Diabetes Mellitus* é uma doença prevalente no mundo, considerada uma epidemia pela organização Mundial de Saúde (OMS). A estimativa da prevalência mundial está em torno de 8,3 % e, no Brasil em 9,4 % na última avaliação. A forma mais comum de diabetes em crianças e adolescentes é o DM1, correspondendo a 10% de todos os casos. O adequado controle glicêmico no diabetes está relacionado diretamente com a redução no desenvolvimento e na severidade das complicações associadas à patologia como a retinopatia, neuropatia, nefropatia e doença cardiovascular. O 1,5 anidroglucitol, um poliol de origem natural derivado da glucose, está associado com incursões hiperglicêmicas. Um teste diagnóstico que quantifica no soro o 1,5-anidroglucitol (1,5AG) foi recentemente aprovado pelo FDA como um índice de controle glicêmico em pacientes diabéticos. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do biomarcador 1,5 anidroglucitol e suas associações com variantes genéticas -429 T>C, -374 T>A e a deleção de 63pb da região promotora do gene RAGE, que afetam o controle glicêmico em crianças e adolescentes saudáveis e portadores de DM1. A amostra foi composta por 621 adolescentes e crianças saudáveis para estabelecimento dos valores de referência para o 1,5 AG e composta de 90 pacientes com DM1 e 105 crianças saudáveis para as análises dos polimorfismos. O 1,5AG foi quantificado em sistema automatizado utilizando o ensaio enzimático (GlycoMark).Comparando os resultados obtidos para a concentração do 1,5 AG no grupo de adolescentes, crianças e DM1, pode se observar uma diferença signifivativa entre os grupos, crianças obteram uma concentração média de 27,9±7,4, adolescentes de 25,4±6,9 e 2,3(1,5-3,4) em pacientes DM1, essa diferença tambem foi significativa entre os gêneros em ambos os grupos. O polimorfismo -374 A tem uma frequência simular a outros estudos com caucasoides em ambos os grupos, DM1 e controle, o -429 C foi similar a euro-brasileiros e menor que caucasoides no grupo controle e menor que euro-brasileiros no grupo DM1e na deleção de 63 pb, os pacientes DM1, obtiveram frequência similar a caucasoides e o grupo controle similar a afro-brasileiros e maior do que caucasoídes em geral. Podemos concluir que os valores de 1,5 AG diminuem com a idade e que meninos apresentam uma concentração significativamente maior do que meninas. O estudo dos polimorfismos se encontra dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os polimorfismos -429 T>C, -374 T>A e 63 pb Del da região promotora do gene RAGE não foram associados com o DM1.

Palavras Chave : Diabetes tipo 1, 1,5AG, -429T>C, -374T>A, 63 Pb Del.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a common disease and is considered, an epidemic by the World Health Organization (WHO). The estimated worldwide prevalence is around 8.3% and in Brazil is 9.4% in the last assessment. In diabetes, adequate glycemic control is directly related to the reduction in the development and severity of complications associated with the disease such as retinopathy, neuropathy, nephropathy and cardiovascular disease. The 1.5 anhydroglucitol is a natural polyolthat origin derived from glucose,is associated with hyperglycemicincursions. A diagnostic test that quantifies the serum 1,5-anhydroglucitol (1,5AG) was recently approved by the FDA as an index of glycemic control in diabetic patients.In thisstudy,we analyzed the effect of 1.5 anhydroglucitol biomarkerand its association with genetic variants -429 T> C, -374 T> A and the deletion of 63pb of RAGE gene that affect glycemic control in healthy children and adolescents and with Diabetes mellitus type 1. The sample was consisted of 621 healthy adolescents and children to establish the reference values for the 1.5 AG, and composed of 90 patients with T1DM and 105 healthy children for the polymorphisms analysis. The 1,5AG was quantified using the enzymatic assay system (GlycoMark).Comparing the results obtained for the 1,5 AG concentration on the children, teenagers and DM1 group,can be observed one significative difference between the groups, childrens obtained one average concentration of 27,9±7,4, teenagers of 25,4±6,9 and pacients with DM1 2,3(1,5-3,4), its diference also was sigficative between the genres in both groups. The polymorphism -374 A have a frequence similar with others studies with caucasoids in both groups, the -429 C it was similar with euro-brasiliens in the control group and smaller than caucadoids, on the DM1 group smaller than euro-brasilien andonpolymorphism 63 pb Deletion, the DM1 pacients, obteined similar frequence with caucasoidsand the control group similar with afro-brasiliens and bigger than euro-brasiliens. We conclude that 1,5 AG value decrease with age and boys have a significantly higher concentration than girls. The studied polymorphisms were in the Hardy-Weinberg equilibrium. The Polymorphisms -429 T>C, -374 T> A, 63 pb Del, in the promoter region of the RAGE gene were not associated with DM1.

Keywords:Diabetes type 1,1,5 AG, -429T>C, -374T>A, 63 Pb Del

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-HISTORIA NATURAL DO DIABETES TIPO 1 21
FIGURA 2 CRITÉRIO DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS TIPO 1 IMUNO MEDIADA... 27
FIGURA 3 REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DAS MOLÉCULAS DE 1,5AG E D-GLICOSE E MODELO DA REABSORÇÃO TUBULAR DO 1,5AG E GLICOSE EM CONDIÇÕES DE NORMO- E HIPERGLICEMIA.....30
FIGURA 4-ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS IGG E RAGE 34
FIGURA 5-MAPA DO GENE RAGE E PRINCIPAIS VARIANTES GENÉTICAS 36
FIGURA 6.FLUXOGRAMA DO PROJETO 38
FIGURA 7 PESQUISA DE OUTLIERS PARA 1,5 ANIDROGLUCITOL (1,5AG). 52
FIGURA 8 HISTOGRAMAS DA DISTRIBUIÇÃO DO 1,5 ANIDROGLUCITOL NOS GRUPOS EM ESTUDO 55
FIGURA 9.COMPARAÇÕES ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE 1,5AG E GÊNERO NOS GRUPOS EM ESTUDO.....57
FIGURA 10.COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS EM ESTUDO (ANOVA). 59
FIGURA 11.CURVA DA CARACTERÍSTICA DE OPERAÇÃO DO RECEPTOR (ROC) PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E COM DM1. 61
FIGURA 12. INTERVALO DE REFERÊNCIA PARA A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE 1,5 ANIDROGLUCITOL EM RELAÇÃO À IDADE EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS. 63
FIGURA 13.ELETROFORESE DO PRODUTO DE PCR DO PROMOTOR DO GENE RAGE .. 64
FIGURA 14.GENOTIPAGEM POR RFLP DO POLIMORFISMO -429T/C.. 65
FIGURA 15.GENOTIPAGEM POR RFLP DO POLIMORFISMO -374T/A..... 66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E CLÍNICAS DOS PACIENTES COM DM1 E CONTROLES NA AMOSTRA EM ESTUDO..... 45
TABELA 2 . PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS DIABÉTICOS TIPOS 1 E CONTROLES NA AMOSTRA EM ESTUDO..... 49
TABELA 3. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA PARA ESTUDO DE AVALIAÇÃO DO 1,5AG. 53
TABELA 4 .INTERVALO DE REFERÊNCIA PARA 1,5 ANIDROGLUCITOL EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES. 62
TABELA 5. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS -429T>C, -374T>A E DEL 63 PB DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE NA AMOSTRA EM ESTUDO 67
TABELA 6. COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -429T>C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE COM DADOS DA LITERATURA..... 68
TABELA 7.COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS EALÉLICAS DO POLIMORFISMO -374T>A DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE COM DADOS DA LITERATURA..... 70
TABELA 8.COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DA DELEÇÃO DE 63 PB DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE COM DADOS DA LITERATURA..... 74

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.CLASSIFICAÇÃO DO DIABETES. 13
QUADRO 2. CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO DIABETES. 14
QUADRO 3. CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO *DIABETES MELLITUS* 17
QUADRO 4. COMPARAÇÃO ENTE O 1,5 AG E HBA1C NO DIABETES. 32
QUADRO 5. VARIABILIDADE GENÉTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE EM ESTUDO 41
QUADRO 6. CONDIÇÕES PARA REAÇÃO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE. 41
QUADRO 7 PROTOCOLOS PARA A REAÇAO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE RAGE POR PCR-RFLP 42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA	Associação Americana de Diabetes
1,5 AG	1,5 Anidroglucitol
AGE	Produtos de Glicação Avançada
AVC	Acidente vascular cerebral
CGM	Continuous glucose monitoring
Curva ROC	Curva de operação de receptor
DAC	Doença arterial coronariana
DCCT	Diabetes control and complications trial
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DMT1A	Diabetes melltus tipo 1 baseado em imunidade
DMT1 fulminante	Diabetes tipo 1 fulminante
DMT1B	Diabetes idiopatica
EDIC	Epidemiology of diabetes Interventions and complications
FC	Fibrose cistica
GAD	Anticorpo Anti-descarboxilase do ácido glutamico
GDJ	Glicemia plasmatica em jejum
GP2h	Glicose plasmatica pós 2h
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HLA	Sistema de histocompatibilidade humano
HPP	Hiperglicemia pós-prandial
IA2A-IA2B	Antigeno 2 associado ao insulinoma
IAA	Anticorpo anti-insulina
ICA	Anticorpo anti-celulas de ilhotas
IRS	Insuficiência renal severa
LADA	Diabetes latente auto-imune do adulto
MODY	Diabetes da maturidade de inicio precoce
ND	Nefropatia diabetica
Outliers	Valores atípicos
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PCR-RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
RAGE	Receptor para produtos de glicação avançada
RD	Retinopatia diabetica

RDP	Retinopatia diabética proliferativa
SMBC	Self monitoring of blood glucose
TOTG	Teste Oral de Tolerância a Glicose
WHO	Organização mundial da saúde
ZnT8	Anti-transportador de zinco 8

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO 9

2.0 OBJETIVO 12

2.1.OBJETIVO GERAL 12

.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 12

3. REVISÃO DE LITERATURA 13

3.1. DIABETES MELLITUS (DM) 13

3.2. DIABETES TIPO 1 (DM1) IMUNO MEDIADA (T1A) 19

3.2.1.Susceptibilidade genética 22

3.2.3.Fatores Ambientais 23

3.2.4. Epidemiologia 24

3.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DO DM1 25

3.3.1 Monitoramento do Controle Glicêmico 28

3.4. 1,5 ANIDROGLUCITOL (1,5AG) 29

3.5 VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DIABETES 32

3.5.1 Os Produtos de Glicação Avançada (AGEs) 33

3.5.2 O gene RAGE (Receptor for Advanced Glycation end Products). 34

4. MATERIAIS E MÉTODOS 38

4.1. AMOSTRAS 38

4.2. DOSAGENS BIOQUÍMICAS 39

4.3. ANÁLISES MOLECULARES 40

4.3.1. Extração do DNA genômico 40

4.3.1. Genotipagem dos polimorfismos -374T>A, -429T>C do promotor do gene RAGE por PCR- RFLP 41

4.3.1.1. Reação de PCR para a região promotora do gene RAGE 41

4.3.1.2. Reação de PCR-RFLP para os polimorfismos 42

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA 43

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 44

5.1. ESTUDO DA POPULAÇÃO 44

5.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS 48

5.3. AVALIAÇÃO DO 1,5 ANIDROGLUCITOL 52
5.4 ANÁLISES MOLECULARES 63
5.4.1. Detecção dos polimorfismos -429T>C, -374T>A e Del 63 pb do promotor do gene RAGE *por PCR-RFLP 64*
6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS 75
7.0 CONCLUSÕES 76
REFERÊNCIAS.....77

1.INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença de elevada prevalência, considerada epidêmica pela organização mundial de saúde (OMS). A estimativa da prevalência mundial é de cerca de 8,3 % e, no Brasil corresponde a 9,4 % na última avaliação (IDF, 2013). A incidência do DM aumenta de modo alarmante nos países em desenvolvimento, tanto em adultos quanto em adolescentes.Estima-se um aumento de 60% do numero de casos na população adulta acima de 30 anos em 2025, sendo a faixa etária de mais atingida entre 45 e 64 anos (MARASCHIN *et al.*, 2010).

O DM está entre as cinco doenças com maior morbimortalidade e se caracteriza por uma síndrome metabólica identificada por hiperglicemia decorrente da falta de secreção de insulina, da ação da insulina ou ambos (AKCILAR *et al.*, 2014).

O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune, caracterizada pelo destruição das celulas β pâncreáticas produtoras de insulina (BLUESTONE, HEROLD e EISENBARTH, 2010; TODD, 2010). Os sintomas clássicos de poliúria, polidipsia e polifagia associados à hiperglicemia permanecem como marcas do diagnóstico da doença em crianças e adolescentes, e em menor proporção em adultos. A cetoacidose por vezes é a manifestação inicial que precede o diagnóstico do DM1. A necessidade de reposição de insulina exógena também é uma característica do DM1 (ATKINSON e EISENBARTH, 2014).

O diabetes está associado com alterações vasculares agressivas; e os benefícios do controle glicêmico na redução no risco para as complicações microvasculares estão bem estabelecidos e correlacionadas com a hemoglobina glicada (HbA1c) (DCCT, 1993; NATHAN *et al.*, 2005).

A HbA1c como biomarcador para predizer o desenvolvimento das complicações do DM tem sido contestada em estudos recentes que falharam em demonstrar alterações nos desfechos cardiovasculares com a redução da HbA1c (ACTION TO CONTROL CARDIOVASCULAR RISK IN DIABETES STUDYGROUP, 2008; ADVANCED COLABORATIVE GROUP, 2008; EMERGING RISK FACTORS, 2014). A HbA1c transmite uma mensagem complexa da hiperglicemia (COHEN, 2007; SERVICE e O'BRIEN, 2007; KOHNERT *et al.*, 2009), e várias condições patológicas comodoença renal, hepática, anemia hemolítica, hemoglobinopatias

associadas podem causar resultados não acurados (SAUDEK, DERR e KALYANI, 2006). Este biomarcador não captura flutuações rápidas nas concentrações de glicose ou prove informações sobre a dinâmica da homeostasia da glicose (KOHNERT *et al.*, 2007). Estes achados têm reforçado que outros biomarcadores são necessários para predizer as complicações diabéticas cardiovasculares e avaliar a eficiência da terapia. Entre estes outros marcadores a albumina glicada, a frutosamina e o 1,5-anidroglucitol (1,5AG) tem recebido interesse crescente como marcadores glicêmicos alternativos (KOHNERT *et al.*, 2015).

O 1,5-AG é um novo biomarcador para o controle da glicemia pós prandial, fornecendo informação sobre o controle glicêmico nas 24-48 horas anteriores ao teste (YAMANOUCHI*et al.*, 1992; YAMANOUCHI *et al.*, 1996). Portanto, o 1,5-AG apresenta uma informação diferenciada e relevante, somando-se aos demais ensaios laboratoriais. A metodologia para a quantificação no soro do 1,5AG foi recentemente aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como uma ferramenta laboratorial para o controle glicêmico em diabéticos. Embora não esteja comercialmente disponível no Brasil, este ensaio é realizado rotineiramente desde 1991 no Japão (KOSAKA *et al.*, 1991, BUSE *et al.*, 2003).

O envolvimento de fatores genéticos no diabetes é reconhecido de longa data (SCHEUNER, 2001; NOVELLI *et al.*, 2003; MAHAJAN e DHAWAN, 2013; ROBERTS, 2014; TANG *et al.*, 2014; TANG, ZENG e ZHANG, 2015). Múltiplos genes e polimorfismos de um único nucleotídeo estão envolvidos no diabetes (FREDERIKSEN *et al.*, 2013; GONZALEZ *et al.*, 2013; STANKOV, BENC e DRASKOVIC, 2013; EVANGELOU *et al.*, 2014).O receptor para produtos finais de glicação avançada (*receptor for advanced glycation end products* - RAGE) é um destes genes associados ao DM. O receptor RAGE é membro da superfamília de imunoglobulinas de moléculas de superfície celular e interage com diferentes ligantes associados a distintos processos patológicos (BASTA, 2008; LIN, PARK and LAKATTA, 2009; SORCI *et al.*, 2013). A interação de RAGE com AGEs (produtos de glicação avançada), promove o estresse oxidativo e subsequentemente evoca injúria vascular no diabetes.

Os polimorfismos -429 T>C (rs1800625), -374 T>A (rs1800624) e Del 63 pb (-407 a -345 pb) na região promotora do gene RAGE estão associados ao aumento de sua expressão (HUDSON *et al.*, 2008) e associados ao DM1 em alguns estudos

(PETTERSSON-FERNHOLM, FORSBLOM e HUDSON*; et al.*, 2003; PICHETH *et al.*, 2007a; FORBES *et al.*, 2011).

Neste estudo, buscamos estabelecer um intervalo de referência para a concentração sérica do 1,5AG (1,5 anidroglucitol) em crianças e adolescentes, estudo inédito na população brasileira, bem como buscar sua associação com outros biomarcadores utilizados no controle glicêmico (hemoglobina glicada e a glicemia pós prandial). Também avaliamos três polimorfismos da região promotora do gene RAGE e sua associação com o DM1.

2.0 OBJETIVO

2.1.Objetivo geral

Estudar o intervalo de referência dos biomarcadores 1,5 anidroglucitol (1,5AG) e suas associações com variantes genéticas que afetam o controle glicêmico em crianças e adolescentes saudáveis e portadoras de *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1).

.2.2. Objetivos Específicos

2.2.1 Comparar os resultados do 1,5 AG obtidos com os valores de hemoglobina glicada, outros marcadores do controle glicêmico e marcadores laboratoriais de função renal e lípidica;

2.2.2 Avaliar o uso do 1,5 AG como marcador de controle glicêmico no Diabetes tipo 1;

2.2.3 Estabelecer valores de referência para população Brasileira ;

2.2.4 Associar as variações genéticas estudadas com os biomarcadores em estudo, com ênfase nos associados ao controle glicêmico e no perfil lipídico.

2.2.5 Buscar novos biomarcadores laboratoriais ou moleculares para o diagnóstico precoce do diabetes em crianças e adolescentes.

2.2.6 Detectar as frequências genotípicas e alélicas para as variações genéticas dos polimorfismos -429 T>C, -374 T>Ae Del 63 pb, em pacientes com DM1 e indivíduos saudáveis;

2.2.7 Associar as variantes genéticas aos marcadores laboratoriais para controle glicêmico.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. DIABETES MELLITUS (DM)

O *Diabetes Mellitus* (DM) é classificado como um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina ou em ambos (AKCILAR *et al.*, 2014).

O DM é uma doença frequente e de acordo com a Organização Mundial da Saúde, mais de 180 milhões de pessoas têm diabetes e este número será provavelmente maior que o dobro em 2030. Nesse cenário, o Brasil terá uma população de aproximadamente 11,3 milhões de diabéticos. Esse aumento ocorrerá principalmente nas faixas etárias mais altas (MENDES *et al.*, 2011).

A incidência do DM1 tem aumentado mundialmente por várias décadas (DABELEA, 2009). Onkamo e colaboradores (1999) reportaram que a incidência global do DM1 está aumentando 3% ao ano. O Grupo do Projeto DIAMOND (2006) estimou um amento global anual na incidência de 2,8% entre 1990 e 1999.

A Associação Americana de Diabetes (ADA) propõe uma classificação baseadas na etiologia das várias formas do diabetes amplamente aceita na comunidade científica (FOWLER, 2007).As quatro grandes categorias do diabetes são diabetes Tipo 1 (DM1), diabetes Tipo2 (DM2), diabetes gestacional (DMG) e outras formas específicas de diabetes, que estão representadas no Quadro 1.

QUADRO 1.Classificação do diabetes.
***Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1):** compreende o diabetes que é primariamente resultado de destruição das células pancreáticas e é propenso a cetoacidose. Esta forma inclui casos decorrente de um processo auto-imune e aqueles em que a etiologia da destruição das células beta são desconhecidas.
***Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2):** pode variar entre resistência predominante à insulina com deficiência relativa de insulina a um defeito secretor de insulina predominante com resistência.
Diabetes mellitus gestacional (DGM): É definido como a intolerância a glucosecom início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez .
Outros tipos específicos: que incluem uma grande variedade de condições relativamente desconhecidas, principalmente formas geneticamente definidas específicas de diabetes ou diabetes associado a outras doenças ou uso de drogas.

Fonte: Modificado do ADA (ADA, 2015) e CDA (CDA, 2013),(BUCHANANet al.2007; ADA, 2009)

O diagnóstico do diabetes é estabelecido por meio da presença de hiperglicemia. Por muitos anos o único método recomendado para o diagnóstico foi

uma demonstração direta da hiperglicemia, medindo as concentrações de glicose aumentada no plasma (SACKS *et al.*, 2011). Os critérios diagnósticos estão sumarizados no Quadro 2 e se baseiam principalmente na glicose de jejum (8 horas), nos pontos de jejum e de 2h após sobrecarga oral com 75 g de glicose, na glicemia ao acaso e na hemoglobina glicada. O diagnóstico correto e precoce do DM e as alterações da tolerância à glicose são muito importantes porque permitem que sejam tomadas medidas terapêuticas que podem evitar o surgimento de diabetes nos indivíduos com tolerância diminuída e retardar o aparecimento das complicações crônicas nos pacientes diagnosticados com diabetes(GROSS *et al.*, 2002).

Para o diagnostico do DM1 a manifestação clinica, associada a sintomas, mas uma glicemia ao acaso >200, já consegue diagnosticar o paciente.

QUADRO 2. Critérios diagnósticos do diabetes.
HbA1C ≥ 6,5% (em adultos). O ensaio deve ser realizado em laboratório utilizando um método que seja certificado pela NGSP e padronizado para o ensaio DCCT na ausência de fatores que afetam a acurácia da A1C e não para a suspeita do DM1 (texto).*
ou
Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL. Jejum é ausência da ingestão de alimentos por pelo menos 8 horas. *
ou
Glicose Plasmática pós 2h ≥ 200 mg/dL durante o TOTG. O teste deve ser realizado como descrito pela WHO, utilizando sobrecarga de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidro dissolvida em água. * ou 1,75g/Kg em crianças .
ou
Em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica, glicose plasmática casual ≥ 200 mg/dL. A glicemia "casual" é definida como a dosagem de glicose a qualquer hora do dia sem ter em conta o tempo decorrido desde a refeição anterior.
*Na ausência de hiperglicemia inequívoca, os resultados devem ser confirmados pela repetição do teste em outro dia. Quando a glicose plasmática casual se encontrar elevada em indivíduos assintomáticos deve ser confirmado com um teste alternativo. No caso de hiperglicemia sintomática, o diagnóstico pode ser feito e um teste confirmatório não é requerido antes de iniciar o tratamento. Indivíduos em que o DM1 seja possível (jovem ou magro ou hiperglicemia assintomática, especialmente com cetonúria ou cetonemia) os testes confirmatórios não devem atrasar o início do tratamento evitando a rápida deterioração. Se resultados de dois testes estão disponíveis e ambos estão acima do valor de corte, o diagnóstico do diabetes é confirmado.

HbA1c: hemoglobina glicada fração A1c; NGSP: *National Glycohemoglobin Standardization Program*; DCCT:*Diabetes Control and Complications Trial*; TOTG: teste de tolerância oral a glicose; WHO: Organização Mundial de Saúde.
Fonte: Adaptado de ADA (ADA, 2015) e CJD (CDA, 2013).

A concetração da glicemia plasmática em jejum (GPJ) de 126 mg/dL se correlaciona muito bem com o valor de 200 mg/dL de glicose plasmática pós 2h

(GP2h) no teste oral de tolerância à glicose (TOTG), e cada um prediz o desenvolvimento da retinipatia (MCCANCE *et al.*, 1994; ENGELGAU *et al.*, 1997; THEEXPERTCOMMITTEEONTHEDIAGNOSISANDCLASSIFICATIONOFDIABETES MELLITUS, 1997; ITO *et al.*, 2000; MIYAZAKI *et al.*, 2004; TAPP *et al.*, 2006; COLAGIURI *et al.*, 2011).

A relação entre a HbA1C e a retinopatia é similar à da GPJ e GP2h com um limite por volta de 6,5% (MCCANCE *et al.*, 1994; ENGELGAU *et al.*, 1997; THEEXPERTCOMMITTEEONTHEDIAGNOSISANDCLASSIFICATIONOFDIABETES MELLITUS, 1997; INTERNATIONAL EXPERT, 2009; COLAGIURI *et al.*, 2011). O diagnóstico o diabetes tipo 2 pode ser baseado no limiar de HbA1C e o desenvolvimento da doença microvascular, HbA1C também é um fator de risco contínuo cardivascular e um melhor preditor de de eventos macrovasculares que GPJ e GP2h (SARWAR *et al.*, 2010; SELVIN *et al.*, 2010).

Embora muitas pessoas identificadas como diabéticas pela HbA1C não apresentam diabetes pelos critérios tradicionais de glicose e vice-versa, existem várias vantagens do uso da HbA1C para o diagnóstico do diabetes tipo 2 (REPORTOFAWORLDHEALTHORGANIZATIONCONSULTATION, 2011). A HbA1C pode ser dosada em qualquer hora do dia e é mais conveniente que GPJ ou GP2h em 75 g no TOTG. A dosagem de HbA1C também evita problemas de variabilidade de dia para dia dos valores de glicose uma vez que refletea média da glicose plasmática em um período prévio de 2 a 3 meses (ADA, 2015). Para utilizar a HbA1C como um critério diagnóstico, a HbA1C precisa ser ensaiada utilizando um método padronizado validado pelo NGSP-DCCT (*National Glycohemoglobin Standardization Program-Diabetes Control and Complications Trial*).

É importante notar que a HbA1C pode ser enganosa em indivíduos com várias hemoglobinopatias, deficiência de ferro, anemias hemolíticas e doença severa hepática e renal (GALLAGHER, ROITH e BLOOMGARDEN, 2009). Adicionalmente, estudos de varias etnias indicam que afro americanos, índios americanos, hispânicos e asiáticos possuem valores de HbA1C que chegam a ser até 4% maiores do que em pacientes caucasianos com concentrações similares de glicose plasmática (HERMAN *et al.*, 2007; ZIEMER *et al.*, 2010). A frequência da retinopatia começa a aumentar em menores porcentagens de HbA1C em negros americanos do que em brancos americanos, o que sugere um menor valor de corte para diagnóstico de diabetes em pessoas negras (TSUGAWA *et al.*, 2012). Os valores de HbA1C

também são afetados pela idade, aumentando até 0,1% por década de vida (PANI *et al.*, 2008; DAVIDSON e SCHRIGER, 2010). A determinação da HbA1C também não é recomendada para fins diagnósticos em crianças, adolescentes, gestantes e aqueles com suspeita de DM1.

Em algumas circunstâncias o diabetes pode ser de difícil diagnóstico como o caso de diabetes com início entre 25 e 30 anos, durante a gravidez e em pacientes em hemodiálise, às vezes sendo necessária a utilização de outros exames laboratoriais. Entre estes, encontram-se marcadores de auto-imunidade, como a medida de auto-anticorpos relacionados à insulite pancreática e a avaliação da reserva pancreática de insulina através da medida do peptídeo C e da fase rápida de secreção de insulina (GROSS *et al.*, 2002).

As tentativas de distinguir casos de DM1 e DM2 em adultos e a descrição de outras formas de diabetes imune ampliaram a classificação do diabetes: diabetes tipo 1 fulminante (HANAFUSA e IMAGAWA, 2007), diabetes dupla (POZZILLI e BUZZETTI, 2007; CHILLARON *et al.*, 2014), e diabetes latente auto-imune do adulto (*latent autoimmune diabetes of adults* – LADA) (POZZILLI e DI MARIO, 2001; LESLIE *et al.*, 2008). Ainda, mais recentemente tem sido levantada a hipótese de que o diabetes tipo 2 envolva alterações de resposta auto-imune (VELLOSO, EIZIRIK e CNOP, 2013). Assim, a classificação atual do diabetes poderia ser reconsiderada (Quadro 3).

Diabetes baseada em imunidade (T1A): resulta da destruição auto-imune celular mediada das células beta do pâncreas e existem marcadores de destruição imune que podem ser úteis para o diagnóstico e predição do T1A (WINTER e SCHATZ, 2011). Auto-anticorpos associados com T1A incluem: anti-células de ilhotas (*islet cell autoantibodies* – ICA), anti-descarboxilase do ácido glutâmico (*glutamic acid decarboxylase* -GAD), anti-tirosina-fosfatase (*insulinoma-associated autoantigen 2*alpha and beta: IA2A e IA2B), anti-insulina (*insulin autoantibodies* - IAA), e anti-transportador de zinco 8 (*zinc transporter 8* -ZnT8) (BLANTON *et al.*, 2011; ADA, 2015). A taxa de destruição das células beta é variável, sendo mais rápida em lactentes e crianças do que em adultos. Imunoterapias tem sido testadas, na sua maioria em modelos animais mas também em humanos (VAN BELLE,COPPIETERS e VON HERRATH, 2011). O T1A é definido pela presença de um ou mais destes marcadores de auto-imunidade (ADA, 2015).

QUADRO 3. Classificação e características clínicas do *Diabetes mellitus*						
Características	**T1A**	**T1B idiopatica**	**T1 Fulminante**	**Diabetes duplo**	**LADA**	**DM2**
Genética	Poligênico	?	Poligênico	Poligênico ?	Poligênico ?	Poligênico
Idade de início	Principalmente de 6 meses até juventude, mas pode aparecer em qualquer idade	Qualquer idade	Principalmente de jovens adultos, mas pode aparecer em qualquer idade e durante a gravidez ou logo após o parto	Crianças e adolescentes	Adultos	Principalmente adultos, mas pode aparecer em qualquer idade
Apresentação Clínica	Geralmente Aguda	?	Grave aguda	Variável; lenta, suave ou aguda	Variável; lenta, suave ou aguda	Variável; lenta, suave ou aguda
Auto-imunidade	Presente (ICA, GADA, IA-2, IAA, ZnT8A)	Ausente	Geralmente ausente, GAD pode ser detectado em alguns casos	Presente (GAD, IA-2, IAA)	Presente (GAD ou ICA)	Ausente, porém e descrito em alguns estudos anticorpos IgG associados com resistência a insulina e auto-anticorpos contra ilhotas pancreáticas
Cetose	Comum	Comum	Comum	Incomum	Incomum	Incomum
Obesidade	Frequência da população	Frequência da população	Frequência da população	Frequência aumentada	Frequência aumentada	Frequência aumentada
Acanthosis nigrans	Não	Não	Não	Pode ocorrer	Pode ocorrer	Sim
História familiar de diabetes	Talvez (2-4%)	?	Talvez	Talvez	Sim	Sim (80%)
Requerimento de insulina	Sim	Sim	Sim	Talvez	Usualmente não	Talvez

T1A: diabetes autoimune; T1B: diabetes idiopática; Fulminante T1: diabetes tipo 1 fulminante; LADA: diabetes latente auto-imune do adulto (*latent autoimmune diabetes of adults*); DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; ICA:auto-anticorpos contra células das ilhotas(*islet cell autoantibodies)*; GAD:auto-anticorpos contra ácido glutâmico descarboxilase(*glutamic acid decarboxylase*); IA2A:auto-anticorpos contra antígeno 2 associado ao insulinoma(*insulinoma-associated autoantigen 2*); IAA:auto-anticorpos contra insulina(*insulin autoantibodies*); ZnT8A: auto-anticorpos contra transportador de zinco 8 (*zinc transporter 8*).
Fonte: Canivell e Gomis (2014).

Diabetes idiopática (T1B): formas de DM1 com a etiologia desconhecida. Estes pacientes apresentam insulinopenia permanente e estão propensos á cetoacidose, mas sem evidência de auto-imunidade. Embora apenas uma minoria de pacientes se inclua nesta categoria, os que o fazem, a maioria apresentam descendência africana ou asiática. Esta forma de diabetes é fortemente herdada, não existe

evidência imunológicapara a auto-imunidade das células beta, e não está associado ao HLA (ADA, 2015). Um subgrupo de indivíduos dentro do tipo 1B apresentam formas monogênicas de diabetes, tais como o diabetes de maturidade de início no jovem (MODY – *Maturity Onset Diabetes of the Young*) (HATTERSLEY *et al.*, 2009).

Diabetes tipo 1 fulminante (fulminante T1): é definida como um subtipo de DM1 com início notavelmente agudo. Tem sido descrito no Japão e em outros países da Ásia oriental. A patogênese permanece desconhecida, mas sugere-se que tanto a genética (especialmente genes de HLA) quanto viroses (HANAFUSA e IMAGAWA, 2007) estejam envolvidos. Este tipo de DM1 é diagnosticado quando os seguintes critérios estão presentes (IMAGAWA e HANAFUSA, 2011): presença de cetoacidose logo após o início dos sintomas de hiperglicemia (elevação de corpos cetônicos na urina e sangue), concentrações plasmática de glicose $\geq$ 288 mg/dL e A1c $<$ 8,5% na primeira visita, excreção urinária de peptídeo C $<$ 10 μg/dia ou concentrações plasmáticas de petídeo C em jejum $<$ 0,3 ng/mL e $<$ 0,5 ng/mL após sobrecarga de glucagon endovenoso (ou refeição) no início. Outras características podem estar presentes, tais como a presença de sensação de frio e sintomas gastrointestinais antes do início, gravidez e aumento plasmático das enzimas pancreáticas (HANAFUSA e IMAGAWA, 2007). Uma vez que se suspeita do diagnóstico, o tratamento deve ser iniciado imediatamente. Atenção especial deve ser dado às complicações microvasculares uma vez que foi descrito o precocemente (SHIBASAKI, IMAGAWA e HANAFUSA, 2012).

Diabetes latente auto-imune do adulto (*latent autoimmune diabetes of adults* – LADA):engloba um grupo de pacientes com características de DM2 e com marcadores de auto-imunidade (POZZILLI e DI MARIO, 2001). O diagnóstico do LADA deve ser feito se houver evidência de: diabetes sem requerimento de insulina durante vários meses após o diagnóstico, início na idade adulto, GAD e ICA positivos (LESLIE *et al.*, 2008). Contudo, a definição de LADA permanece em debate e alguns argumentam que esta entidade deveria ser denominada de diabetes auto-imune (ROLANDSSON e PALMER, 2010).

Diabetes duplo: O diagnóstico pode ser difícil devido a sobreposição de sintomas do DM1 e DM2. O diagnóstico incluiria a presença de características clínicas do DM2

(obesidade de resistência à insulina), em crianças e adolescentes história familiar de DM1 e DM2, e inclui a presença de caraterísticas clínicas de DM1 e positividade para auto-anticorpos (GAD, IA-2A, IAA). È caracterizado pela presença de hiperglicemia em crianças e adolescentes com a combinação de marcadores do tipos 1 e 2 de diabetes.(POZZILLI and BUZZETTI, 2007).

Diabetes tipo 2 (DM2): a principal causa desta doença permanece desconhecida, embora a disfunção das células beta tenha sido proposta como o mecanismo que resulta na manifestação do DM2 (ASHCROFT e RORSMAN, 2012). Dados recentes mostraram que fatores imunológicos também estão envolvidos na patogênese da resistência a insulina e DM2 (VELLOSO, EIZIRIK e CNOP, 2013) levando a questionamentos se o DM2 poderia ser categorizado como diabetes auto-imune e se o termo tipo 2 não seria tendencioso (ASHCROFT e RORSMAN, 2012).Similarmente, os subtipos de DM2 em crianças são fracamente caracterizados (DABELEA *et al.*, 2007).

Considerando que os doentescom diabetes tipo 2 podem teros níveis de insulina parecendo normais ou elevados, níveis elevadosde glicose no sanguenestespacientesseria esperado devidovalores de insulinaainda mais elevados, sendo sua funçãode células βnormal.Assim, secreção de insulinaédeficientenestes pacienteseinsuficientedevido a resistência à insulina. A resistência à insulinapode melhorarcomredução de pesoe/ou tratamento farmacológico dahiperglicemia mas raramenteé restauradoao normal (ADA,2015).

3.2. DIABETES TIPO 1 (DM1) IMUNO MEDIADA (T1A)

O *Diabetes mellitus*tipo 1 (DM1) imuno mediada (T1A) previamente denominada de diabetes insulino-dependente ou diabetes de início juvenil, contribuim com 5-10% dos casos de diabetes na infância (ADA, 2015) e é uma condição na qual a destruição imuno mediada das células beta pancreáticas leva à deficiência absoluta de insulina (DEVENDRA, LIU e EISENBARTH, 2004; DANEMAN, 2006). O desenvolvimento do T1A envolve um grau de susceptibilidade. Esta susceptibilidade é principalmente herdada, uma vez que foi mostrado forte agrupamento em algumas famílias, comuma taxa de recorrência entre irmãosde 6%, euma taxa de concordância entre gêmeosmonozigóticosde 30-50% (TODD, 1990;

KYVIK, GREEN e BECK-NIELSEN, 1995; HYTTINEN et al., 2003; ANAYA et al., 2006). Evidências mais diretas são observadas em fortes associações entre várias variantes genéticas e DM1. O primeiro locus de maior fator de risco foi detectado no início de 1974 por Nerup e colaboradores, seguido por Cudworth e Woodrow que detectaram uma associação com o sistema HLA (CUDWORTH e WOODROW, 1975). Estudos recentes de mapeamento genético e de gene-fenótipo lançam luz sobre as possíveis origens do DM1 através da indicação de vias biológicas potenciais relevantes na doença (POCIOT *et al.*, 2010). A maioria dos genes candidatos para DM1 são expressos nas ilhotas pancreáticas, sugerindo que eles regulalam ao menos parte dos mecanismos patogênicos a nível de células beta. Foi mostrado recentemente que alguns destes genes candidatos regulam a inflamação pancreática e a apoptose das células beta (SANTIN e EIZIRIK, 2013).

Em adição à susceptibilidade genética, fatores ambientais e mudanças epigenéticas são requeridas para alterar o sistema imune, e assim iniciar a destruição das células beta (DANEMAN, 2006; TODD, 2010). A ativação anormal do sistema imune mediada pelas células T em indivíduoas susceptíveis leva a resposta inflamatória dentro das ilhotas (insulite) bem como à resposta humoral (células B) com produção de anticorpos para antígenos das células beta. Os anticorpos contra as células das ilhotas (*islet cell autoantibodies* – ICA)foram os primeiros a serem descritos, mas foram suplantados por auto-anticorpos mais específicos: insulina (*insulin autoantibodies* - IAA), descarboxilase do ácido glutâmico (*glutamic acid decarboxylase* -GAD), eantígeno 2 associado ao insulinoma (*insulinoma-associated autoantigen 2* - IA2A) (DEVENDRA, LIU e EISENBARTH, 2004). A presença de um ou mais anticorpos pode preceder o aparecimento clínico do DM1 por anos. A positividade de múltiplos anticorpos aumenta a probabilidade de progressão para doença clínica (KRISCHER *et al.*, 2003; BARKER *et al.*, 2004). Não há evidência de que qualquer um destes anticorpos tenham função na patogênese desta doença em humanos. Destruição progressiva das células beta resulta na manifestação clínica do DM1 (DANEMAN, 2006; EISENBARTH, 2010). Estudos recentes tem sugerido que, previamente à insulite, ocorre proliferação das células beta em indivíduos geneticamente susceptíveias ao DM1 (ROWE *et al.*, 2011). Contudo, permanece difícil a identificação de como a proliferação das células beta é induzida. Ainda, devido a questões não resolvidas, tais como em humanos o grau de insulite é discreto, afeta poucas ilhotas e está presente em apenas 1/3 dos casos de DM1

manifesto, coloca em dúvida se DM1 realmente é uma doença auto-imune mediada por células T. E a lenta progressão do DM1 ao longo dos anos e o benefício e efeito limitados de imunosupressores favorecem esta hipótese. Então é proposto que o DM1 poderia ser uma doença inflamatória que afeta todo o pâncreas mas com manifestações clínicas que emanam principalmente dadas da perda das células produtoras de insulina (SKOG *et al.*, 2013).Para resumir, o desenvolvimento de diabetes foi dividido em seis etapas começando com susceptibilidade genética e terminando com total ou quase destruição das células beta (Figura 1), (EISENBARTH G S., 1986).

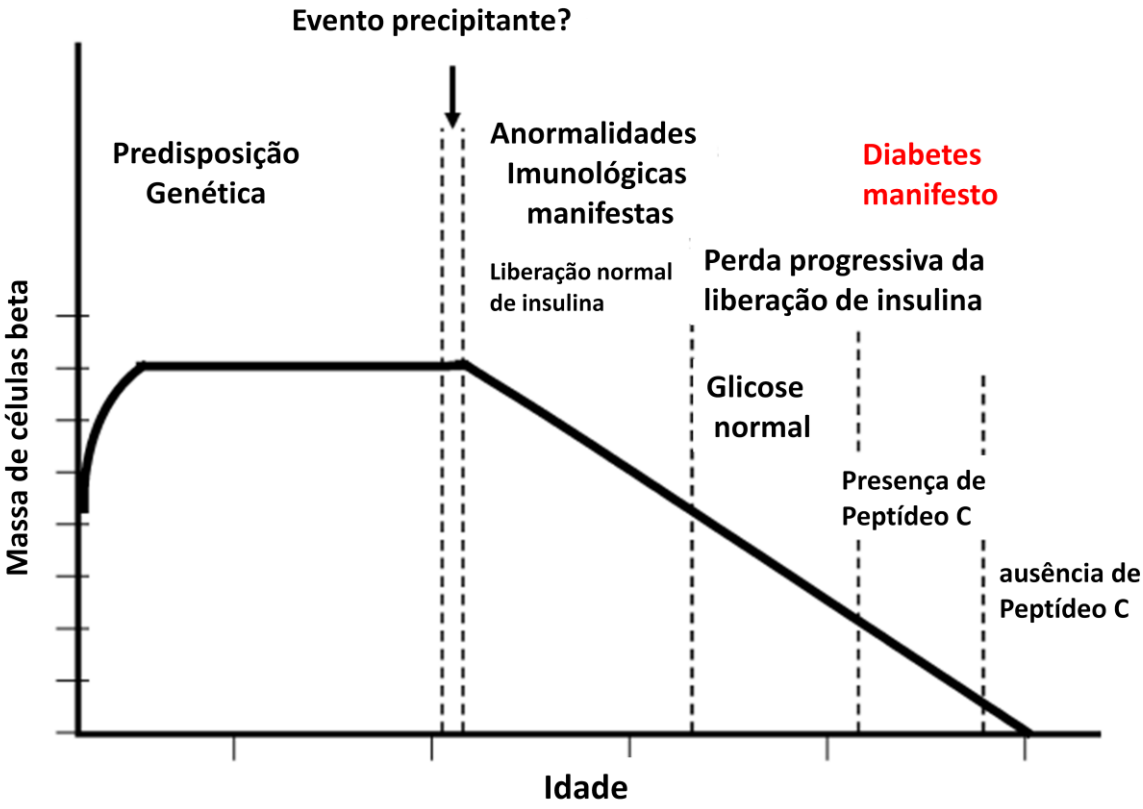


Figura 1-Historia natural do Diabetes tipo 1
Fonte:Adaptado de Eisenbarth e Jeffrey, (1986)

Contudo, a patogênese do DM1 é multifatorial e alguns aspectos permanecem desconhecidos. Estudos adicionais são necessarios para esclarecer os mecanismos patogênicos e poder desenvolver novas estratégias diagnósticas e de tratamento (HEROLD *et al.*, 2013).

3.2.1.Susceptibilidade genética

O DMT1A é uma doença poligênica, e que até o momento cerca de 40 locus parecem afetar a suceptibilidade à doença (CONCANNON, RICH e NEPOM, 2009). A maioria destes genes associados ao DM1 está relacionada com o sistema imune e, pode predispor o indivíduo à uma resposta imune ou inflamatória exacerbada à um dado estímulo, aumentando potencialmente o risco de auto-imunidade. Outros, podem afetar a função da célula β-pancreática e apresentação de antígeno (PIROT, CARDOZO e EIZIRIK, 2008; ATKINSON, EISENBARTH e MICHELS, 2014).

A região do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) no cromossomo 6 (locus IDDM1 – *locus insulin-dependent diabetes mellitus 1*) é responsavel por aproximadamente metade da suceptibilidade genética ao de DM1 (NOBLE *et al.*, 2010). Entre os diferentes tipos HLA, o de classe II mostrou a mais forte associação com o DM1. Muitos estudos investigaram o risco dos haplótipos HLA-DRB1-DQB1 em diferentes populações e mostraram que vários haplótipos estão associados com um diferente espectro de risco para doenças, variando de forte susceptibilidade até quase completa proteção (MIJOVIC *et al.*, 1991; RONNINGEN *et al.*, 1991; ERLICH, *et al.*, 1993; NOBLE *et al.*, 1996; SHE, 1996; THORSBY; UNDLIEN, 1996; PARK, *et al.*, 1998; CUCCA *et al.*, 2001; SCHIPPER *et al.*, 2001; KOELEMAN *et al.*, 2004). Os haplótipos *DRB1*0401-DQB1*0302 e DRB1*0301-DQB1*0201* conferem grande susceptibilidade e os haplótipos *DRB1*1501* e *DQA1*0102-DQB1*0602* proteção à doença (ERLICH, *et al.*, 2008). Um estudo de meta-análise envolvendo 38 estudos de 30 países concluiu uma consistente e significativa predisposição hierárquica para *DQB1*0302-DRB1*0401=*0402=*0405>*0404>*0403*. Este estudo também concluiu que o efeito de predisposição do *DRB1*0301-DQB1*0200* é significativamente menor que *DRB1*0402-DQB1*0302* e maior que *DRB1*0404-DQB1*0302 (THOMSON et al., 2007)*. Noble e colaboradores (2010) mostraram que a classe Ido HLA também influencia o risco para o DM1, independentemente das moléculas da classe II.

O efeito do locus HLA no risco de DM1 é provavelmente devido à apresentação inadequada de auto-antígenos para o linfócito durante o seu processo de maturação no timo, levando à ineficiente deleção dos linfócitos auto-reativos. Em concordância com esta hipótese, a expressão transgênica dos alelos de risco da

classe II do sistema HLA em camundongos sensibiliza o sistema imune para auto-antígenos da célula β-pancreática, tais comoGAD (WONG e WEN, 2004).

Com relação aos demais locus, apenas aqueles para sequências repetitivas altamente variáveis próximas ao gene de insulina (*Variable Number of Tandem Repeats* – VNTR - *near the Insulin gene* – INS), antígeno 4 associado *ao* linfócito T citotóxico (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* - CTLA4), Proteína Tirosina Fosfatase não *Receptora* Tipo 22 *(phosphatase non-receptor type 22* - PN22) e subunidade alfa de Receptor de Interleucina-2 *(alpha-subunit of the IL-2 receptor - IL2RA)* estão associados ao DM1 com razão de chance (*odds ratios*) maior que 1,1 (KIM e POLYCHRONAKOS, 2005; JAHROMI e EISENBARTH, 2007; POLYCHRONAKOS e LI, 2011).

Como a maioria dos genes associados com o risco para DM1 aparentemente está envolvida na resposta imune, a noção de que influências genéticas envolvem mecanismos que coletivamente contribuem para a resposta imune alterada (CONCANNON, RICH e NEPOM, 2009), incluindo o desenvolvimento e manutenção de tolerância. Estes mecanismos poderiam ajudar a explicar as diferenças nas taxas de progressão para o DM1 entre adultos e crianças, onde somente pequenas variações na susceptibilidade genética podem ser percebidas (HOWSON *et al.*, 2011). Susceptibilidade genética pode também influenciar respostas aos estímulos ambientais ou vias fisiológicas (por exemplo, vitamina D e helicase interferon induzida) (BLANTON *et al.*, 2011; WINKLER *et al.*, 2011).

3.2.3.Fatores Ambientais

Tem sido proposto que várias influências ambientais afetam a epidemiologia do DM1 (MACLAREN e ATKINSON, 1992), dieta das crianças e adolescentes (KNIP, VIRTANEN e AKERBLOM, 2010), vitamina D e constituintes da via da vitamina D (SVOREN *et al.*, 2009; BLANTON *et al.*, 2011; COOPER *et al.*, 2011), viroses (YEUNG, RAWLINSON e CRAIG, 2011; STENE e REWERS, 2012), hábitos de higiene (BACH e CHATENOUD, 2012), microbiota intestinal (BOERNER e SARVETNICK, 2011) e produtos finais de glicação avançada (*Advanced glycation end products* – AGEs), contudo, nenhum agente específico com influência inequívoca na patogênese foi identificado (ATKINSON, EISENBARTH e MICHELS,2014).

3.2.4. Epidemiologia

Embora o DM1 possa ser diagnosticado em qualquer idade, é uma das doenças crônicas mais comuns em crianças (GALE, 2005). Picos na apresentação da doença ocorrem entre 5-7 anos de idade ena puberdade ou perto dela (HARJUTSALO, SJOBERG e TUOMILEHTO, 2008).Enquanto a maioria das desordens autoimunes afetam de forma desproporcinal as mulheres, o DM1 é discretamente mais comum em meninos e homens (OSTMAN *et al.*, 2008).

A incidência varia de acordo com mudanças sazonais e mês de nascimento. Mais casos são diagnosticados no outono e inverno (MOLTCHANOVA *et al.*, 2009) e também o fato de ter nascido na primavera está associado a uma maior chance de desenvolvimento de DM1 (KAHN *et al.*, 2009).O desenvolvimento do auto-anticorpos em meses ou anos antes do ínicio dos sintomas da doença, também mostra um sincronismo sazonal (KUKKO *et al.*, 2005). Estes dados suportam um papel teórico para um agente ambiental iniciar ou governar o processo patogênico no DM1 (ATKINSON e EISENBARTH, 2014).

Globalmente, a incidência e a prevalência do DM1 varia substancialmente (MAAHS et al., 2010) (Figura 1). O DM1 é mais comum na Finlândia (>60 casos por 100.000 pessoas a cada ano) e Sardenha (aproximadamente 40 casos por 100.000 pessoas a cada ano) (PATTERSON *et al.*, 2009). A alta incidência observada na Sardenha é notavelmente discordante da observada na Itália como um todo. É incomum na China, Índia e Venezuela (aproximadamente 0,1 caso por 100.000 pessoas a cada ano). Em geral países da Europa e América do Norte têm incidências altas e intermediárias da doença. Na África geralmente é intermediária e na Ásia é baixa,com a notável exceção do Kuwait (FOROUHI e WAREHAM, 2014).

No Brasil, temos poucos estudos epidemiológicos sobre o diabetes tipo 1, porém em estudo abrangendo três cidades do interior paulista, constatou-se uma incidência de 7,6 /100.000 habitantes nesta população (BALDA, PACHECO-SILVA, 1999).

A incidência global do DM1 representa um enígma epidemiológico; uma ampla variação na incidência da doença é observada entre áreas vizinhas na Europa e na América do Norte. Por exemplo, a incidência na Estônia é menos que 1/3 da

incidência na Finlândia, sendo que os dois países se encontram separados por uma distância menor que 120 Km (PODAR *et al.*, 2001).

A incidência do DM1 tem aumentado mundialmente por várias décadas (DABELEA, 2009) e desde o inicio do século 20. Gale (2002) demonstrou como os dados evoluem de uma incidência baixa e estável na primeira metade do século para um aumento evidente na segunda metade. Onkamo e colaboradores (1999) reportaram que a incidência global do DM1 está aumentando 3% ao ano. O Grupo do Projeto DIAMOND (2006) estimou um amento global anual na incidência de 2,8% entre 1990 e 1999.

Na Finlânida, Alemanhã e Noruega um aumento anual na incidência relatado foi 2,4%, 2,6% e 3,3%, respectivamente (THUNANDER *et al.*, 2008; PATTERSON *et al.*, 2009; EHEHALT *et al.*, 2012). Em muitos países o aumento da incidência tem flutuado, embora na Suiça tem se observado uma estabilização mais recentemente (BERHAN *et al.*, 2011). Se a taxa de incidência continuar a aumentar na mesma proporção, a incidência global poderá dobrar na próxima década (PATTERSON *et al.*, 2009). Os aumentos de incidência não ocorrem igualmente nos diferentes grupos etários. Na Europa, o aumento tem sido mais substancial em crianças com menos de 5 anos de idade (DIAMOND PROJECT GROUP, 2006; HARJUTSALO, SJOBERG e TUOMILEHTO, 2008). Os mecanismos envolvidos na diferença de incidência geográfica e nas taxas de aumento do DM1 são desconhecidos, mas têm sido largamente atribuídos às influências ambientais. Mudanças genéticas ou número de crianças nascidas de mães DM1 não conseguem explicar tais rápidas taxas de aumento de incidência (SOLTESZ *et al.*, 2007). Finalmente, a predisposição genética constitui um fator de menor contribuição atualmente que no passado para o desenvolvimento do DM1 (GILLESPIE *et al.*, 2004; STECK *et al.*, 2011).

3.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DO DM1

Os pacientes com DM1 frequentemente apresentam sintomas agudos do diabetes e concentrações plasmáticas de glicose marcadamente elevadas, e alguns são diagnosticados com cetoacidose uma condição que apresenta risco de vida (ADA, 2015).

Mais recentemente ficou evidente que os critérios para o diagnóstico do DM descritos no Quadro 2 sozinhos não são suficientes para discriminar T1A das outras formas da doença em alguns casos (SEISSLER e SCHERBAUM, 2006). Embora, picos de T1A ocorrem entre as idades de 12 e 20 anos, a doença pode ocorrer em qualquer idade. O início agudo é típico nas crianças, enquanto que em pacientes mais velhos, é mais brando e mais difícil de distinguir do DM2. A identificação dos auto-anticorpos fornecem uma evidência de um processo auto-imune contínuo. Contudo, um resultado negativo não permite exclusão completa do diabetes T1A. A dosagem combinada de ZnT8A, GADA, IA2A e IAA aumenta a taxa de detecção de auto-imunidade para 98% no início do T1A. O ZnT8 foi o último anticorpo identificado, é um multi-transportador de cátions expresso nas ilhotas pancreáticas, e foi identificado através de análises multidimensionais de experimentos de micro-arranjo do perfil de expressão de mRNA (WENZLAU *et al.*, 2007). O auto-anticorpo ZnT8 pode ser detectado no soro de indivíduos com pré-diabetes e persiste em indivíduos com longo tempo de DM1. Esse auto-anticorpo foi relatado em 63% dos indivíduos recém diagnosticados (GAN, ALBANESE-O'NEILL e HALLER, 2012; WATKINS *et al.*, 2014).Em indivíduos não diabéticos, auto-anticorpos de ilhotas são fortes preditores de desenvolvimento futuro de T1A.

Atualmente, as dosagens de GAD e IA-2A são recomendadas para confirmação inicial da suspeita diagnóstica do T1A. Para o diagnóstico do T1A, se GAD e IA-2A forem negativos, as dosagens de ICA, e em crianças, IAA devem ser solicitadas (Figura 2), (WINTER e SCHATZ, 2011). A concentração de IAA em crianças se correlaciona com a taxa de progressão para diabetes Tipo 1, que podem ser acompanhadas desde o nascimento (STECK *et al.*, 2011; PARIKKA *et al.*, 2012).

Os pacientes com DM1 também estão predispostos a outras doenças auto-imunes, tais como doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, doença de Adison, vitiligo, doença celíaca, hepatite auto-imune, miastenia grave e anemia perniciosa (SILVA, MORY e DAVINI, 2008; ADA, 2015).

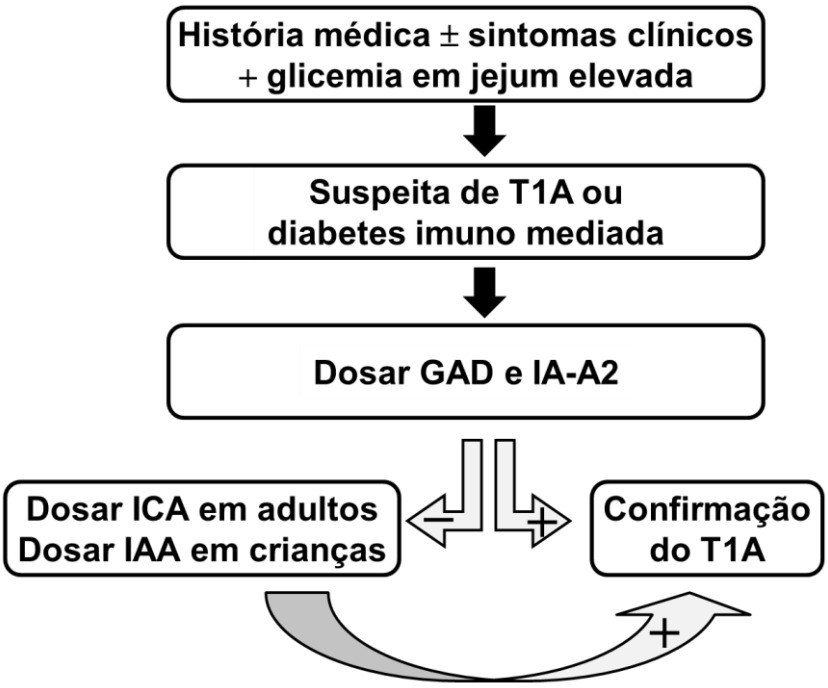


Figura 2 Critério diagnóstico do Diabetes mellitus tipo 1 imuno mediada.T1A: Diabetes tipo 1 imuno mediada; GAD: anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico; IA-A2: anticorpos anti-tirosina-fosfatases 2 alfa; ICA: anticorpos anti-células de ilhotas; IAA: anticorpos anti-insulina.
Fonte: Adaptado de Carnivell e Gomis (2014).

Contudo, de um terço até metade das crianças Americanas Hispânicas e Africanas apresentam a forma de DM1 sem auto-anticorpos, e com histologia pancreática mostrando ausência de ilhotas e completa perda das células β-pancreáticas, isto é, ilhotas pseudo-atróficas (GIANANI *et al.*, 2010). Assim, o DM1 parece representar uma doença heterogênea em que o processo patogênico, a genética e as características fenotípicas mostram marcada variação (ATKINSON, EISENBARTH e MICHELS, 2014).

O perfil lipídico e metabólico também podem servir como marcadores para DM1 eminente. Estes marcadores incluem diminuição da fosfatidil colina no nascimento, triglicerídeos e éter de fosfolipídeos antioxidantes reduzidos seguidos por aumento de lisofosfatidil colina pro-inflamatória vários meses antes da soro conversão para positividade de auto-anticorpos (ORESIC *et al.*, 2008). Outro estudo encontrou concentrações elevadas de triglicerídeos de cadeia ímpar e ácidos graxos polinsaturados contendo fosfolipídeos, e menores concentrações de metionina, em pacientes T1A (PFLUEGER *et al.*, 2011).

Apesar dos esforços para a padronização do diagnóstico do DM1, as causas e tipologia continuam incertas. A distinção entre o DM1 e DM2 é importante devido

ao fato de que as estratégias de monitoramento diferem, mas pode se tornar difícil no momento do diagnóstico em certas situações.Aproximadamente 5-15% de adultos diagnosticados com DM2 podem ser DM1 com presença de auto-anticorpos para ilhotas (TUOMI, 2005); e se este for o caso, talvez em torno de 50% dos casos de DM1 são diagnosticados erroneamente como DM2, significando que o número de casos de DM1 é significativamente subestimado (ATKINSON, EISENBARTH e MICHELS, 2014). O diagnóstico acurado é crucial para tratamento adequado e prevenção das complicações, e a correta detecção da cetoacidose diabética no diagnóstico do DM1é importante parao intervalo de adequado (USHER-SMITH *et al.*, 2011).

Outros fatores que complicam o diagnóstico do DM1 incluem o crescente problema da obesidade em crianças e adultos, dificuldades do profissional de saúde no reconhecimento da doença, e aumento da diversidade genética por miscigenações devido à imigração ou mudanças sociais (WILKIN, 2009; PUETT *et al.*, 2012; SODERSTROM, AMAN e HJERN, 2012).

3.3.1Monitoramento do Controle Glicêmico

Tradicionalmente, pacientes com DM1 sofrem de complicações microangiopáticas, especialmente nefropatia, as quais resultam num impacto negativo no prognóstico e qualidade de vida (CHILLARON, GODAY e PEDRO-BOTET, 2008). Em 1993, o DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) demonstraram que a terapias intensivas para a redução de glicose podem reduzir em até em 50% a incidência de microangiopatia (DCCT, 1993). O EDIC (*Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*), uma extensão de estudo do DCCT, com um seguimento médio de 17 anos, revelou uma redução de 57% no risco relativo de infartos não fatais, derrame ou morte cardiovascular em um grupo que havia recebido terapia intensiva com insulina (NATHAN *et al.*, 2005).

Para acessar a eficiência do controle glicêmico no paciente diabético três técnicas estão disponíveis: automonitoramento das concentrações plasmáticas de glicose (*self-monitoringofblood glucose* – SMBG),por meio da glicemia capilar ou glicose intersticial e HbA1c. Monitoramento contínuo da glicose (*Continuous glucose monitoring* – CGM) pode ser um adjuvante útil ao SMBG (ADA, 2015).

Um outroanalito, 1,5-anidroglucitol (1,5AG), tem sido sugerido para uso como marcador intermediário da glicemia em complementação às dosagens de HbA1c (DUNGAN, 2008).

3.4. 1,5 ANIDROGLUCITOL (1,5AG)

O 1,5 anidroglucitol (1,5AG) foi descrito inicialmente na planta *Polygala senega* em 1888. Sua estrutura química foi identificada em 1943, e a presença do composto no sangue humano, foi mostrada em seguida (PITKANEN *et al.*, 1980; YAMANOUCHI *et al.*, 1989).

É um monossacarídeo que contém seis átomos de carbono em sua estrutura, ou seja, 1-deoxi-glicose, o qual não é metabolizável(Figura 3). Evidências sugerem que 1,5AG se origina principalmente da dieta, com uma pequena (aproximadamente 10%) mas significativa contribuição da síntese endógena, contudo esse mecanismo ainda é desconhecido (TANAKA *et al.*, 1992; YAMANOUCHI *et al.*, 1992).Em geral, cereais, carnes de gado e porco,e grãos de soja contém alta concentração do composto. A ingestão do 1,5AG é balanceada pela excreção urinária (YAMANOUCHI *et al.*, 1992). Koga e colaboradores (KOGA *et al.*, 2010) mostraram que a ingestão diária de produtos está associada com menores concentrações de 1,5AG (diferenças de aproximadamente 2,5-2,7 μg/mL comparado com aqueles sem ingestão diária), independente da concentração plasmática de glicose. Contudo, as dosagens de 1,5AG podem ser pouco afetadas pela variação da dieta porque o pool no corpo é várias vezes maior do que a quantidade ingerida pela dieta, e 1,5AG é bem absorvido no intestino e distribuído para todos os órgãos e tecidos (YAMANOUCHI *et al.*, 1992; DWORACKA *et al.*, 2002).

Normalmente, o 1,5AG filtrado pelo o rim é praticamente todo reabsorvido (YAMANOUCHI *et al.*, 1989). Contudo, quando as concentrações glicêmicas ultrapassam o limiar renal, ocorre redução das concentrações plasmáticas de 1,5AG, devido à inibição competitiva com a glicose pela reabsorção tubular proximal (YAMANOUCHI*et al.*, 1992) (Figura 3). Assim, as concentrações plasmáticas de 1,5AG variam inversamente com glicose urinária, glicemia de jejum e HbA1C (AKANUMA *et al.*, 1988; YAMANOUCHI, 1994).

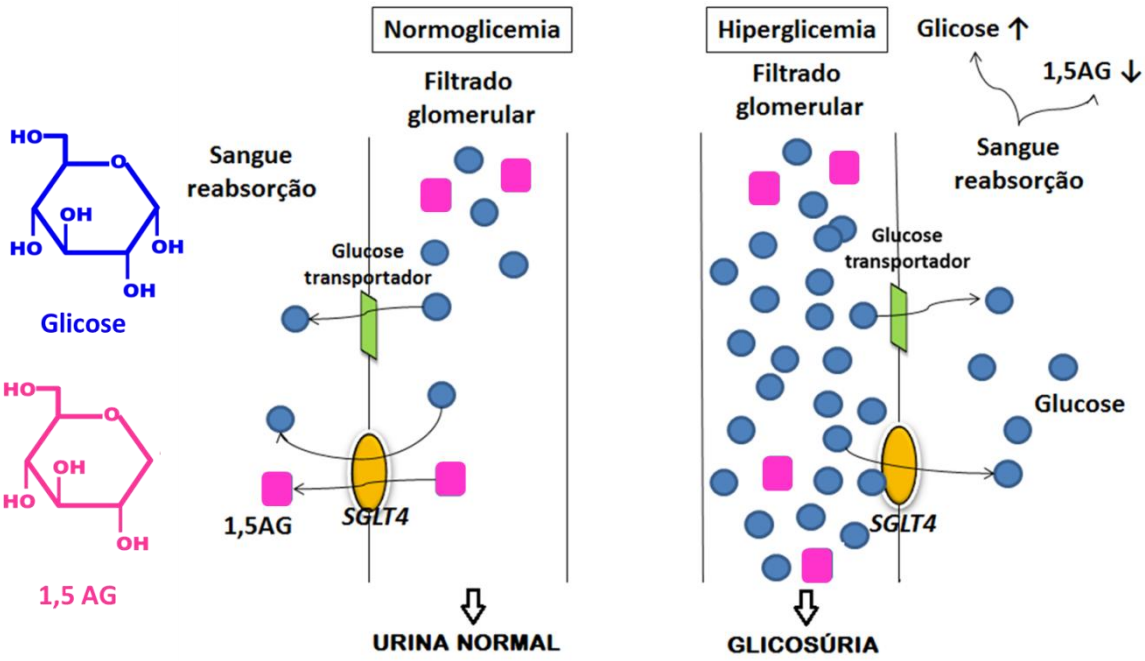


Figura 3 Representação estrutural das moléculas de 1,5AG e D-glicose e modelo da reabsorção tubular do 1,5AG e glicose em condições de normo- e hiperglicemia. Em condições de normoglicemia a glucose (circulos azuis) e o 1,5 anidroglucitol (quadrados rosas) são reabsorvidos do filtrado glomerular por meio de dos transportadores tubulares de glucose (quadrado verde) e SGLT4 (transportador de manose com afinidade para 1,5AG – círculo ovalado laranja). Nesta condição os transportadores recuperam quase totalmente a glucose e o 1,5AG filtrados, sendo perdido na urina quantidades desprezíveis.Na hiperglicemia (glucose > 180 mg/dL) o excesso de glucose presente nos túbulos compete com o 1,5AG pelos transportadores tubulares e como esta presente em concentração muito elevada é reabsorvida, consequentemente provocando a eliminação do 1,5AG pela urina. A resultante na hiperglicemia é a elevação da glicose no sangue concomitante a redução do 1,5AG.
Fonte: Adaptado de Dungan (2008).

Como as concentrações plasmáticas podem ser dramaticamente reduzidas por repetidos episódios de hiperglicemia, o monitoramento do 1,5AG tem sido preconizado para o monitoramento do diabetes como um marcador de controle glicêmico suplementar à HbA1c, especialmente como controle glicêmico recente e hiperglicemia pós-prandial, excursões glicêmicas acima do limiar glicosúrico (KISHIMOTO *et al.*, 1995; BUSE *et al.*, 2003).

As dosagens do 1,5AG parecem ter uso apenas para se avaliar excursões de hiperglicemia, ou seja, hiperglicemia pós-prandial no paciente diabético com uma HbA1c menor que 8%. Não parece ser dependente do tipo de diabetes. A dosagem do 1,5AG parece ter pouca utilidade na detecção de flutuações na detecção de

flutuações abaixo do limiar renal de glicosúria. As concentrações plasmáticas de 1,5AG são estáveis em indivíduos sem glicosúria e parece não ser útil em indivíduos com normoglicemia(KIM e PARK, 2013). Em pacientes com DM1 e DM2 moderadamente controlados (HbA1c entre 6,5-8%), a correlação entre a variabilidade glicêmica e as concentrações plasmáticas de 1,5AG tornam-se mais fortes do que HbA1C e frutosamina(DUNGAN *et al.*, 2006). Contudo, recentes estudos utilizando sistemas de monitoramento contínuo da glicemia (CGM) de pacientes com DM1 (MEHTA *et al.*, 2012) e DM2 (KIM e PARK, 2013), mostraram que o papel do 1,5AG como marcador glicêmico é fraco quando os valores de HbA1c são maiores que 8%. Aparentemente, as concentrações de 1,5AG são menos sensíveis a pequenas mudanças no controle glicêmico após exposição à hiperglicemia extrema crônica.

Alguns estudos demonstraram que devido ao fato do 1,5 AG refletir o status glicêmico em um período de 48 horas a 2 semanas, sua dosagem sequencial poderia ser útil no monitoramento do controle glicêmico e na resposta terapêutica dos pacientes(MCGILL *et al.*, 2004; DUNGAN, 2008; DUNGAN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012). O 1,5AG prediz a glicemia pós-prandial e mudanças dinâmicas na glicemia pós-prandial, as quais são pedidas pela HbA1C em pacientes bem controlados (YAMANOUCHI e AKANUMA, 1994; DUNGAN *et al.*, 2006; WON *et al.*, 2009). Vários estudos mostraram que o 1,5AG apresenta grande variabilidade e é capaz de identificar pacientes com extensivas flutuações glicêmicas independentemente de apresentarem o mesmo valor de HbA1c(YAMANOUCHI e AKANUMA, 1994; DWORACKA e WINIARSKA, KIM e PARK, 2013). Dungan e colaboradores (2008) preconizam na prática clínica o uso seriado de HbA1c e 1,5AG, sendo que primeiramente utilizar a HbA1c para identificar pacientes diabéticos moderadamente ou bem controlados, e em seguida utilizar-se o 1,5AG para determinar a extensão das excursões de glicemia pós-prandial.

O uso do 1,5AG para diagnóstico do DM é controverso, alguns estudos propoem valores de corte entre 10-14 μg/mL (YAMANOUCHI *et al.*, 1991; GOTO *et al.*, 2011; BORITZA *et al.*, 2014), enquanto que outros estudos concluíram que a acuracia diagnóstica foi pobre em qualquer limiar de concentração do 1,5AG (ROBERTSON *et al.*, 1993; TSUKUI e KOBAYASHI, 1995; WON *et al.*, 2009). Uma das justificativas apontadas seria que embora os valores médios da população saudáveis e de diabéticos sejam significativamente diferentes, muitos valores

sobrepostos são observados entre estes grupos (FRATTALI e WOLF, 1994; MCGILL *et al.*, 2004; KIM, WON JUN e PARK 2013).

Desta forma, estes dados sugerem que o1,5-AG poderiam ser um marcadorcomplementar razoável além dos valores de HbA1c (Quadro 4) (WON JUN e PARK 2013).A disponibilidade de um marcador de curto prazo para o controle glicêmico certamente seria uma adição para as ferramentas disponíveis para o monitoramento da glicemia. Existe a necessidade de estudos que avaliem mudanças glicêmicas a curto prazo, e neste contexto o 1,5AG poderia ser útil.

QUADRO 4. Comparação ente o 1,5 AG e HbA1c no diabetes.

	1,5AG	HbA1c
Resposta à hiperglicemia	Inibição de reabsorção	Glicação da hemoglobina
Valores na hiperglicemia	Diminuídos	Aumentados
Intervalo da reflexão da glicemia	Vários dias a semanas	Média de 2-3 meses atrás
Mudanças mais observadas	Controle glicêmico moderado (A1c < 8%)	Hiperglicemia média-alta
Correlação com variabilidade glicêmica e HPP	Grande	Pequena
Triagem para o DM	Não disponível	Confirmado
Identificação de subtipos de DM (Fulminante T1; MODY)	Possível	Insuficiente
Estratificação de risco para DM	Insuficiente	Recomendado
Correlação com as complicações do DM	Insuficiente	Confirmado
Limitações	Gravidez; hipertrigliceridemia extrema; DHC; IRS; FC; estado de gastrectomia	Anemia; hemoglobinopatia; transfusão; uremia; DHC ou alcoolismo; hemodiálise

1,5AG: 1,5 anidroglucitol; A1c: Hemoglobina glicada fração A1c; HPP: hiperglicemia pós-prandial; DM: *Diabetes mellitus*; Fulminante T1: diabetes tipo 1 fulminante; MODY: *Maturity Onset Diabetes of the Young*; DHC: doença hepática crônica; IRS: insuficiência renal severa; FC: fibrose cística.
Fonte: Kim e Parker (2013).

3.5VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO DIABETES

A interação entre produtos finais de glicação avançada (*Advanced glycation end products* – AGEs) e o receptor para AGEs (*Receptor for Advanced glycation end products* – RAGE) está relacionada ao início e à progressão do diabetes (BUCCIARELLI *et al.*, 2002; VALKO *et al.*, 2007), bem como às complicações microvasculares do DM (SINGH *et al.*, 2001; VLASSARA e PALACE, 2002; KIRITOSHI *et al.*, 2003; YAMAGISHI *et al.*, 2012). Variantes no gene RAGE podem alterar esta via de eventos pela modificação na expressão de RAGE, e assim afetar a gravidade da patologia.

3.5.1 Os Produtos de Glicação Avançada (AGEs)

Os produtos de glicação avançada (AGEs) resultam da glicação não enzimática de proteínas e lipídeos que se acumulam durante o envelhecimento normal e em taxas aceleradas no diabetes (BROWNLEE, CERAMI e VLASSARA, 1988; RUDERMAN, WILLIAMSON e BROWNLEE, 1992; BROWNLEE, 1995). Tem sido sugerido que no diabetes, o acúmulo de AGE devido à hiperglicemia está envolvido na patogênese da doença vascular (SCHMIDT*; et al.*, 1994; WAUTIER *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 1998).

A hiperglicemia crônica do diabetes está associada como desenvolvimento progressivo das complicações específicas como a retinopatia, com potencial cegueira, nefropatia que pode conduzir à falência renal e/ou neuropatia com risco de úlceras dos pés, amputações, artropatia de Charcot e aspectos de disfunção autonômica, incluindo sintomas gastrintestinais, geniturinários, cardiovasculares e disfunção sexual (PAIVA, 2001).

AGEs são heterogêneos em estrutura, exibem pigmentação caraterística amarela-amarronzada, fluorescência e têm propensão a formar reações cruzadas (MONNIER *et al.*, 1986; BROWNLEE, CERAMI e VLASSARA, 1988; OIMOMI *et al.*, 1988). Os AGEs são especialmente reconhecidos por sítios de ligação celular (BROWNLEE, CERAMI e VLASSARA, 1988; ESPOSITO *et al.*, 1989).

Vários receptores celulares, que apresentam capacidade de ligação com os AGEs, foram identificados em diferentes tipos de células, incluindo RAGE (receptor para AGE) (SCHMIDT, 1992), galectina-3 (VLASSARA, BUCALA e STRIKER, 1994), SRA (Receptores *scavenger* de macrófagos classe A tipos I e II) (NORIE ARAKI *et al.*, 1995), fosfoproteína 80K-H e OST-48 (Oligosacarídeo transferase-4), (LI *et al.*, 1996; THORNALLEY, 1998). Entre estes, apenas os receptores RAGE e galectina-3 não se enquadram na designação de “receptores da família *scavenger*”.

A interação de AGE-RAGE pode ativar várias cascatas, incluindo NADPH-oxidase/fator nuclear-Kappa β (*nuclear factor-kb* – NF-Kβ) (HUTTUNEN, FAGES e RAUVALA, 1999; WAUTIER *et al.*, 2001) e talvez as vias p21ras/MAP-quinases/inibidor do ativador do plasminogênio-1 (*plasminogen-activator inhibitor*–PAI-1) (LANDER *et al.*, 1997), e então induzir extresse oxidativo, disfunção celular, aumento da permeabilidade vascular, expressão de moléculas de adesão, produção de citocinas e ativação da coagulação (SCHMIDT *et al.*, 1994).

3.5.2 O gene RAGE (Receptor for Advanced Glycation end Products).

O receptor para produtos de glicação (RAGE) é um membro da super família de imunoglobulinas de receptores de superfície celular que desempenha um papel importante na promoção da inflamação (HOFMANN *et al.*, 1999; DONATO, 2007) àlem de apresenta grande homologia com moléculas de adesão celular neural (*neural cell adhesion molecule* – NCAM) (NEEPER *et al.*, 1992; SCHMIDT, 1992). RAGE exibe grande distribuição tecidual (BRETT *et al.*, 1993) e interage com uma grande quantidade de ligantes, incluindo produtos finais da glicação avançada (AGEs), HMGB1 e S100b(AL-SWAILEM *et al.*, 2014).

Segundo Schmidt e Stern(2000), o receptor é uma proteína de aproximadamente 45 kDa e possui uma porção extracelular, que inclui 332 aminoácidos, compreendendo domínio tipo 1V seguido por dois domínios tipo C (NEEPER *et al.*, 1992; SCHMIDT, 1992; SCHMIDT e HORI*; et al.*, 1994). Os determinantes estruturais do receptor que medeiam a ligação ao AGE estão localizados no domínio V na região N-terminal. Depois da região extracelular existe o domínio transmembrana e uma cauda citosólica curta e altamente carregada na região N-terminal (NEEPER *et al.*, 1992) (Figura 4).

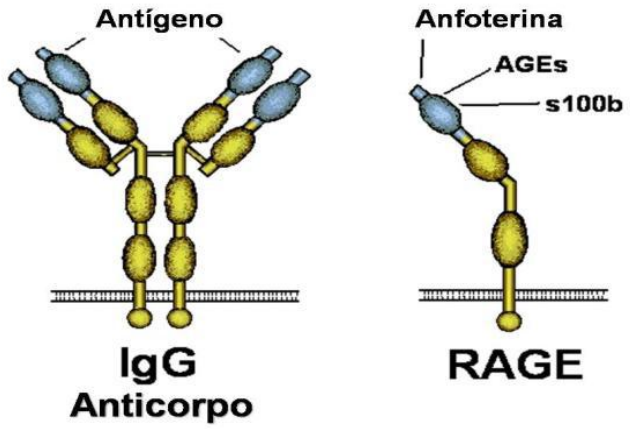


Figura 4-Estrutura das proteínas IgG e RAGE. Comparação entre as estruturas da proteína RAGE com anticorpos do tipo IgG, ambos da família das imunoglobulinas. Os possíveis sítios de ligação para anfoterina, AGEs e S100b em RAGE e para antígenos na IgG são apontados. Os domínios tipo V estão representados em azul e os domínios tipo C, transmembrana e a cauda citosólica estão representados em amarelo na imunoglobulina IgG e no RAGE. As barras paralelas tracejadas representam a membrana plasmática.
Fonte: Adaptado de Wikipedia, 2015.

Na homeostasia normal, aparentemente a função de RAGE é ligar e internalizar as baixas concentrações de AGE para degradação; contudo, no diabetes, devido a interação sustentada pelas altas concentrações de AGEs, parece resultar em ativação mediada por receptor e secreção de várias citocinas (SCHMIDT*et al.*, 1999). Isto induz uma cascata de expressão de proteínas (SCHMIDT *et al*., 1999), entre elas o aumento da expressão do fator tecidual (*tissue fator* – TF) (BIERHAUS*et al*., 1997) e inibidor do ativador do plasminogênio-1 (*plasminogen-activator inhibitor-1* - PAI-1) (YAMAGISHI *et al.*, 1998) que promove um estado prócoagulante. A disfunção endotelial ocorre pelo recrutamento de monócitos via mecanismos dependentes de RAGE para os sítios de acúmulo de AGEs (SCHMIDT *et al.*, 1993). Aparentemente, uma alça de retroalimentação de aumento de expressão de RAGE, através do fator nuclear-Kβ, resulta da interação AGE-RAGE para aumentar estes efeitos (SCHMIDT *et al.*, 1999). Ou seja, no diabetes, a interação sustentada entre AGE-RAGE pelas altas concentrações de AGE aumenta a expressão de RAGE e a ativação de vias pró-inflamatórias e prócoagulantes, resultando em disfunção vascular (STERN *et al.*, 2002; HUDSON *et al.*, 2003).

Diferenças herdadas em sítios de ligação transcricionais chaves envolvidos na regulação do gene RAGE podem alterar esta via de eventos pelo aumento ou diminuição na expressão de RAGE.Já foram identificados cerca de 50 polimorfismos no gene*RAGE* (HUDSON *et al.*, 2008). O gene RAGE está localizado no cromossomo 6p21.3 no locus MHC e é composto por uma região 5’ flanqueadora de 1,5 Kb, 11 exons e 10 introns (SUGAYA *et al.*, 1994).

Três polimorfismos funcionais foram descritos da região promotora de RAGE (Figura 5), sendo elas -429T>C (rs180025), -374T>A (rs1800624) e a deleção de 63 pb presentes entre -407 e -345 nucleotídeos, os quais foram destacados pelo envolvimento na patogênese das complicações doDM por apresentarem efeito importante na atividade transcricional. A deleção de 63 pb está sobreposta ao polimorfismo -374 T/A(HUDSON *et al.*, 2001b; POON *et al.*, 2010).

Resultados conflitantes tem sido relatados em diferentes populações com relação à associação de polimorfismos no gene RAGE e complicações diabéticas (HUDSON *et al.*, 2001a; GLOBOCNIK-PETROVIC *et al.*, 2003; JIXIONG *et al.*, 2003; LINDHOLM *et al.*, 2006; KANG, TIAN e JIA, 2012).

Com relação ao polimorfismo -429T>C foi encontrado correlação com DM1 (PICHETH *et al.*, 2007b), com retinopatia diabética em pacientes DM2 (HUDSON *et al.*, 2001a), taxa de mortalidade em pacientes em hemodiálise (KALOUSOVA *et al.*, 2010), e risco de doença cardíaca isquêmica (POON *et al.*, 2010), contudo vários estudos não conseguiram replicar as associações em outras populações (GLOBOCNIK-PETROVIC *et al.*, 2003; JIXIONG *et al.*, 2003; PETTERSSON-FERNHOLM; FORSBLOM *et al.*, 2003; KIRBIS *et al.*, 2004; DOS SANTOS *et al.*, 2005; RAMPRASAD *et al.*, 2007; YOON *et al.*, 2007; NG *et al.*, 2012).

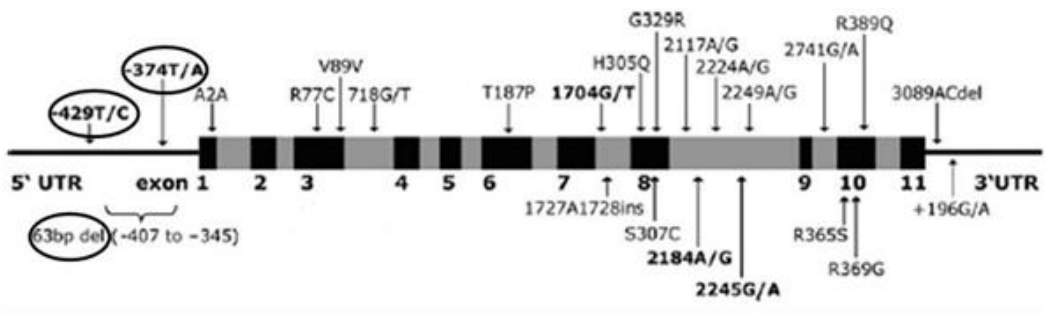


Figura 5-Mapa do gene RAGE e principais variantes genéticas. Os quadrados escuros representam os exons. Os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) do gene *RAGE* mais frequentes e a deleção de 63pb estão representados em negrito com destaque (círculo) para as regiões promotoras estudadas neste trabalho.
Fonte: Kankova e colaboradores (2005).

O alelo -374 A influencia a ligação de um fator de transcrição que está relacionado com a repressão da transcrição do gene *RAGE*(HUDSON *et al.*, 2001a).

O genótipo AA da variante funcional –374 T>A foi associado com proteção para o desenvolvimento e severidade da doença cardiovascular em indivíduos diabéticos tipo 1 (PETTERSSON-FERNHOLM; FORSBLOM *et al.*, 2003), não diabéticos (FALCONE *et al.*, 2004; FALCONE *et al.*, 2005; FALCONE *et al.*, 2008) e indivíduos diabéticos tipo 2 (PICHETH *et al.*, 2007a),redução risco de isquemia em Afro-Brasileiros com diabetes tipo 2 (DOS SANTOS *et al.*, 2005), reestenose após implante de *stent* coronário (FALCONE *et al.*, 2007) e desenvolvimento precoce de IAM (infarto agudo do miocárdio) (BOIOCCHI *et al.*, 2011).

Contudo, também foi observado que o alelo A do polimorfismo –374 T>A constitui um fator de risco para nefropatia e retinopatia diabética em pacientes DM1 (LINDHOLM *et al.*, 2006) e este resultado foi suportado por outros. Na presença do

alelo A foi observado um aumento na atividade transcricional na expressão de RAGE em três vezes (HUDSON *et al.*, 2001a) e superexpressão de RAGE em camundongo diabético transgênico duplo que resultou em aumento da albuminúria e glomeruloesclerose (YAMAMOTO *et al.*, 2001). Similarmente, tratamento com sRAGE pode diminuir o risco de nefropatia em camundongo db/db (WENDT *et al.*, 2003).

A deleção de 63 pares de bases na região promotora do gene *RAGE* (-407 a-354) foi associada com nefropatia diabética na população alemã(KARAVANAKI *et al.*, 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC da UFPR), CAA: 24676613.6.0000.0102.O fluxograma apresentado na(Figura 6) mostra como foi desenvolvido o projeto.

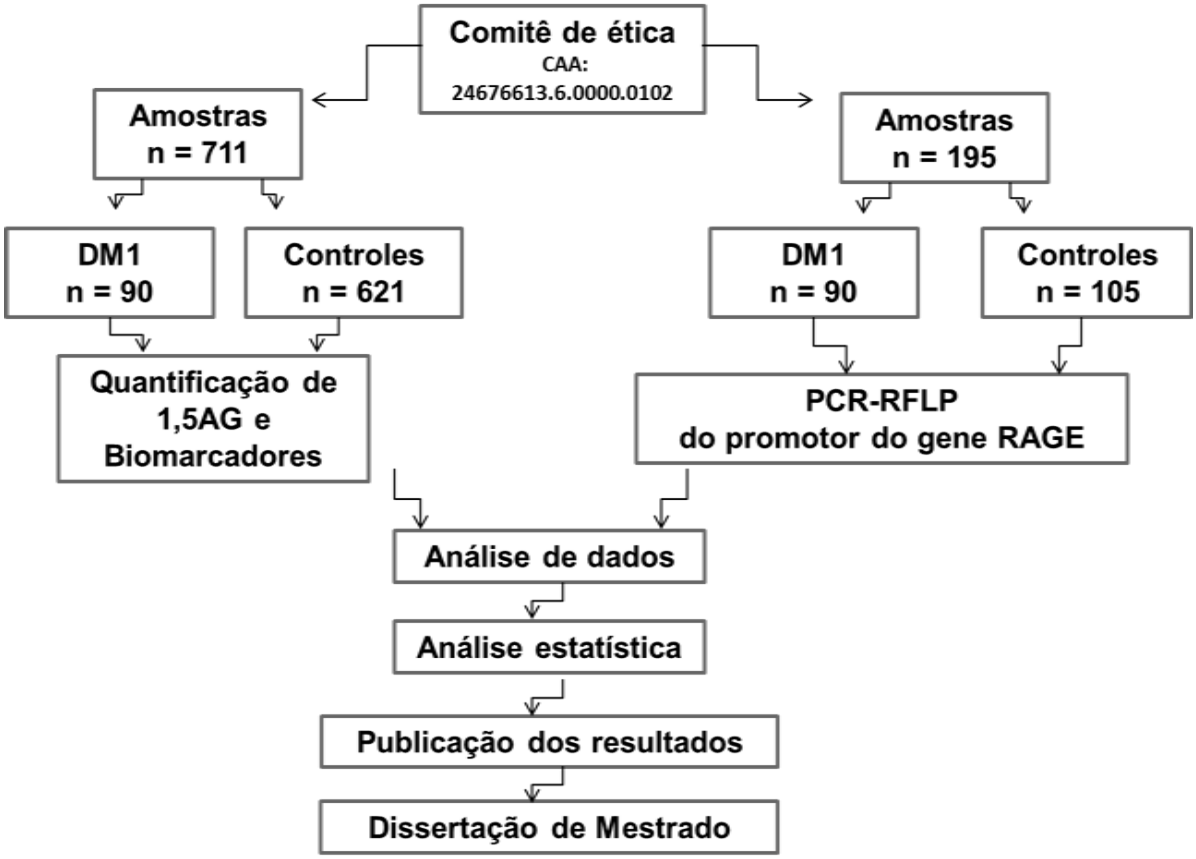


Figura 6. Fluxograma do Projeto. Os grupos em estudos foram compostos de crianças (<12 anos) e adolescentes. Abreviações: n: número amostral; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; 1,5AG: 1,5 anidroglucitol; PCR-RFLP: reação em cadeia da polimerase e Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição; RAGE: receptor para produtos finais de glicação avaçada.
Fonte: O autor (2015)

4.1. Amostras

Foram utilizadas 621 amostras de soro ou plasma-EDTA de indivíduos saudáveis para determinar os valores de referência de 1,5 anidroglucitol (1,5AG). A amostra foi composta por 375 crianças com faixa etária entre 9-10 anos e 246 adolescentes com idade inferior a 18 anos. Para os estudos dos polimorfismos foram

utilizadas 105 amostras de crianças e adolescentes saudáveis e 90 de diabéticas tipo 1.As amostras dos adolescentes e criançasforam coletadas em escolas Estaduais de Curitiba, durante o projeto de extensão Dosagem de Perfil Lipídico e de Glicemia para avaliação nutricional e do diabetes em adolescentes nas escolas estaduais de Curitiba-PR sob registro PROEC:823/13 e sob coordenação da professora Aline Borsato Hauser, e Incidência de Parasitoses e anemias em crianças com idade escolar de Escolas Municipais da cidade de Curitiba sob registro PROEC:47208 esob coordenação do professor Railson Hennemberg, respectivamente. Estas coletas foram realizadas durante o período da manhã e tarde, sendo que as crianças e adolescentes não estavam necessariamente em jejum.

Os pacientes DM1 foram selecionados a partir do ambulatorio de diabetes do Hospital das Clínicas da UFPR e comautorizada participação pelos pais, por meio do do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A seleção dos pacientes diabéticos estave a cargo da professora Dra Suzana Nesi França da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Foram coletadas amostras de 90 pacientes e os dados antropométricos e clínicos foram obtidos através dos dados do prontuário. As amostras de sangue e soro dos pacientes foram coletadas, durante os exames e consultas de rotina, conforme o protocolo do serviço.

As amostras foram coletadas entre setembro de 2013 e novembro de 2014. Foram coletados aproximadamente 4mL de sangue em tubos secos com gel separador sem anticoagulante para obtenção do soro e 4 mL em tubos contendo 7,2 mg do anticoagulante K_2EDTA (BD Vacutiner) para obtenção do plasma e extração de DNA.As amostras coletadas em tubo seco, com gel separador, sem anticoagulante foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm em centrífuga Compacta Z 206A Hermlelogo após a coleta. Após a centrifugação, o soro foi separado em alíquotas (~1,5 mL) e mantido em freezer a -20ºC e -80ºC até a realização das dosagens. Amostras hemolisadas foram excluídas dos ensaios.

4.2. Dosagens bioquímicas

As dosagens de todos os parâmetros bioquímicos nas amostras dogrupo controle e alguns parâmetros (1,5AG, proteínas totais, albumina,HbA1c, Colesterol,

Triglicerideos, ureia, creatinina, ácido úrico, glicemia ao acaso) no grupo DM1 foram realizadas em sistema automatizado Cobas Mira (Roche Diagnóstica LTDA) e Labmax 400 (labtest). Todos reagentes usados para as dosagens de 1,5 anidroglucitol (GlycomarkInc) foram obtidos comercialmente no mercado internacional, incluindo controles e calibradores específicos para o teste.

As dosagens bioquímicas do grupo DM1 conduzidas no Laboratório do Hospital de Clínicas foram realizadas em equipamento Abbott Architect Ci8200.

A dosagem do 1,5AG foi realizada utilizando método enzimático que se baseia na oxidação de açúcares álcoois com estrutura piranose, na hidroxila da posição 2, com o oxigênio molecular, formando 1,5-anidro-D-frutose e H_2O_2. O H_2O_2 resultante é espectrofotometricamente determinado após desenvolvimento de reação de cor com 4-aminoantipirina catalisada pela enzima peroxidase de raíz forte. Para remover a glicose, que se comporta como interferente positivo é utilizado no meio reacional um sistema regenerador de ATP e a enzima glucoquinase, convertendo a glicose em um composto não reagente (glicose-6-fosfato), tornando o método seletivo para 1,5 AG.

4.3. Análises moleculares

4.3.1. Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído pelo método de *salting out*de 195 amostras de crianças e adolescentes, sendo 90 DM1 e 105 controles. Este é um procedimento, que fornece DNA altamente puro, e baseia-se na lise de membranas celulares por detergentes e/ou soluções hipotônicas, seguido da liberação do DNA nuclear. O DNA liberado das células é separado dos restos celulares e proteínas, que são precipitados por uma solução salina saturada. O DNA presente na solução saturada é precipitado pela adição de etanol (LAHIRI e NURNBERGER, 1991).

A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260 e 280 nm (Nanodrop), sendo critério de exclusão amostras com concentração inferior a 20 ng/μL e razão A260/A280 menor que 1,7 ou superior a 2,1, o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra.

4.3.1. Genotipagem dos polimorfismos -374T>A, -429T>C do promotor do gene RAGEpor PCR- RFLP

4.3.1.1. Reação de PCR para a região promotora do gene RAGE

Para a identificação das regiões polimórficas (Quadro 5) do promotor do gene RAGE, foi otimizada a amplificação da região -590 à -246 pb do promotor utilizando oligonucleotídeos iniciadores (Alpha-DNA LTDA) descritos por HUDSON ecolaboradores (HUDSON *et al.*, 2001a) que geram um amplicon de 344 bp.

QUADRO 5. Variabilidade genética da região promotora do gene RAGE em estudo				
Cromossomo	Genes (Abreviatura)	OMIM*	Variações genéticas	dbrs**
6p21. 3	RAGE (AGER)	600214	-429T>C -374T>A 63 Del (-407 a -345 bp)	rs1800625 rs1800624 ----------

*OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man;
Fonte: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=OMIM&cmd=search&term
** dbrs: reference SNP database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)

O Quadro 6 mostra as condições otimizadas de ensaio para esta amplificação.

QUADRO 6. Condições para reação de PCR para amplificação da região promotora do gene RAGE.		
Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da região promotora do gene *RAGE*	Prom F: 5'- GGG GGC AGT TCT CTC CTC -3' Prom R: 5'- TCA GAG CCC CCG ATC CTA TTT -3'	
Reagentes	Concentração final	Volumes para reação de 20µL
Oligonucleotídeos iniciadores (10pmol/µL cada)	1 pmol, cada	2,0µL
DNA molde (100ng/µL)	5 ng	1,0 µL
Tampão Taq 10X*	1x	2,0 µL
dNTP 5mM	0,2mM	0,8µL
$MgCl_2$50mM	1,5 mM	0,6 µL
Água reagente estéril	----------	12,8 µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0,2 U	0,8 µL
Ciclos térmicos:	1 ciclo 94ºC 2min 34 ciclos: 94ºC 1 min 60ºC 1 min 72ºC 1 min 1 ciclo: 72ºC 10 min	

*Tampão Taq 10X concentrado: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mMKCl.
Fonte: O autor (2015)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador Biocycler (Biosystems). Os produtos de PCR foram analisados em relação à quantidade e qualidade por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE1X (Tris-hidroxi-metil-aminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). Uma alíquota de 2µL do produto de PCR acrescido de 3 µL de solução de aplicação (glicerol 30% v/v, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol) foi aplicado no gel. Os produtos de PCR foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador sob luz UV (302 nm) e fotodocumentado com sistema L.PIX (Loccus).

4.3.1.2. Reação de PCR-RFLP para os polimorfismos

A presença dos polimorfismos da região promotora do gene *RAGE* foi caracterizada através da reação de PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) utilizando as enzima de restrição *Tsp509* I (New England BioLabs) para o polimorfismo -374T>A e *Alu* I (New England BioLabs) para opolimorfismo -429T>C.Os protocolos de ensaio estão descritos no Quadro 7.

QUADRO 7 Protocolos para a reaçao de restrição e detecção dos polimorfismos da região promotora do gene RAGE por PCR-RFLP

Polimorfismos		
Reagentes	-374 T/A	-429 T/C
Produto de PCR(~20 ng/µL)	1,25 µL	1,0µL
Tampão (10X concentrado)	0,5 µL (1X)*	0,5 µL (1X)**
Água ultra-pura estéril	3,13 µL	3,4 µL
Enzima de restrição (10U/µL)	0,125 µL (1,25 U) *Tsp509*I	0,1 µL(1U) *Alu*I
Volume final de reação	5,0 µL	5,0 µL
Temperatura de incubação	65°C	37°C
Tempo de incubação	16h	16h

*Tampão Neb 4 10x (New England Biolabs): 100 nM Bis Tris Propano –HCL; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM ditiotreitol; pH 7,0 a 25 °C.
**Tampão React 1 10X (Invitrogen): 500mM Tris-HCl; 100 mM MgCl2; pH 8,0 a 37ºC.
Fonte: O autor (2015)

Os fragmentos de DNA oriundos das reações de PCR-RFLP foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida (19:1) em cuba mini Protean 3, Bio Rad (100x75x0,75mm). Toda a reação de restrição acrescida de 3 µL de solução de aplicação (glicerol 30% v/v, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno

cianol) foi aplicada no gel e visualizada em transiluminador sob luz UV (302 nm) e fotodocumentado com sistema L.PIX (Loccus).

4.4. Análise estatística

As variáveis descontínuas foram comparadas com o teste de Quadrado ($\chi 2$) em tabelas do tipo 2X2 ou em tabelas de contingência com diferentes números de colunas e linhas utilizando o programa disponível em http://www.physics.csbsju.edu/stats/exact_NROW_NCOLUMN_form.html.

As variáveis contínuas foram inicialmente avaliadas quanto à distribuição normal, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis em estudo que não apresentaram distribuição normal em todos os grupos foram analisadas comparativamente pelos testes não paramétricos de Kruskall-Wallis (ANOVA, para comparação de múltiplas variáveis independentes) e teste U de Mann-Whitney (para comparação de duas variáveis independentes) e teste t-Student.

Os valores de média ±1 desvio padrão, mediana (intervalo interquartil, 25%-75%), foram utilizados como estatísticas descritivas neste projeto. A frequência de variáveis discretas foi representada em tamanho amostral (n) ou porcentagem (HTTP://EN.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/RAGE_%28RECEPTOR%29).

Valores de $p<0,05$ foram considerados sigficativos em todas as análises.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle glicêmico eficaz no paciente diabético, especialmente em crianças e adolescentes, é uma dificuldade presente no dia-a-dia, sendo um desafio aos profissionais de saúde (CHRISTAKIS *et al.*, 2001; WAITZFELDER *et al.*, 2011; AMED *et al.*, 2013; GRAY; DOLAN; HOOD, 2013). O adequado controle glicêmico é essencial para evitar ou minimizar as complicações associadas à patologia (DCCT, 1993; WHITE *et al.*, 2001; NATHAN *et al.*, 2005). Um marcador de controle glicêmico a curto prazo, sensível às excursões de glicose poderia fornecer um *feedback* único e valioso após intervenções terapêuticas e nutricionais no DM1, antes que as mudanças nos valores de A1c sejam evidentes. Até o momento, existe um limitado número de informações com relação à utilidade do 1,5AG em jovens com DM1, e estudos adicionais tem sido recomendados (NGUYEN *et al.*, 2007; DUNGAN, 2008; MEHTA *et al.*, 2012).

Além disso, vários genes têm sido associados ao diabetes e excluindo o diabetes monogênico (RETLICH *et al.*), até o presente não foi encontrado um *locus* gênico responsável pela patologia (METZGER *et al.*, 2007). As associações do diabetes tipo 1 com variações genéticas têm sido relatadas primariamente entre as complicações do diabetes tipo 1 e polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs, *single nucleotide polymorphism*) (PETTERSSON-FERNHOLM *et al.*, 2003; PICHETH *et al.*, 2007b; LINDHOLM *et al.*, 2008). Neste estudo estabelecemos os intervalos de referência para crianças e adolescente brasileiras de 1,5 anidroglucitol (1,5AG) e determinamos as frequências genotípicas e alélicas de 3 polimorfismo funcionais na região promotora do gene *RAGE*.

5.1. ESTUDO DA POPULAÇÃO

A análise estatística descritiva dos grupos em estudo, incluindo média, desvio padrão, mediana e amplitude de variação está na Tabela 1. A amostra foi pareada por gênero e idade.

Tabela 1.Características antropométricas e clínicas dos pacientes com DM1 e controles na amostra em estudo

.

Parâmetros	Controle (n=105)	DM1 (n=90)	P
Idade (anos)	11,8 (10-14)	12 (10-13)	0.569*
Gênero (H/M)	50/50	45/45	0,149**
Peso (kg)	48,3±13,7	41,8±13,2	**0,001**
Altura (m)	1,53 ±0,14	1,46±0,16	**0,002**
IMC (kg/m^2)	20,2±3,6	18,9±2,8	**0,008**
Idade ao diagnóstico (anos)		6,9±3,5	
Tempo de diabetes (anos)		4,7±3,1	
Histórico Familiar DM		57/90	
Uso de insulina		90/90	
Comorbidades		31/90	
Hipotireoidismo		5/90	
Doença celíaca		3/90	
Obesidade		2/90	
Doença Arterial coronariana		17/90	
Auto anticorpos		88/90	
ICA		50/90	
IAA		40/90	
GAD		46/90	
IA2A		13/28	
ICA ou IAA ou GAD ou IA2A		88/90	
Peptídeo C		30,3±35,9	

Os valores são média ±DP, mediana (intervalo interquartil) ou frequências
P, probabilidade com o teste t-Student.*Mann-Whiteney ou **Chi-quadrado.
P<0,05 é considerado significativo.
Fonte: O autor (2015).

Idade

Os pacientes analisados apresentaram uma média de idade ao diagnóstico de 6,9±3,5 anos. Esses valores de média estão abaixo dos encontrados em um estudo com os pacientes DM1 realizado no Rio Grande do Sul, onde a maioria dos pacientes apresentou idade de início do diabetes entre 6 a 15 anos, com uma média de idade de 11,3±6,1 anos (SILVEIRA *et al.*, 2001) e similares aos encontrados em uma população de Campinas , onde a média de idade foi de 6,4 ± 3,5 anos (0,3 a 14,2 anos),(WHITACKER; *et al.*, 2008). Contudo, corresponde ao primeiro pico de incidência do DM1, que ocorre entre 6 e 15 anos (HARJUTSALO, SJOBERG e TUOMILEHTO, 2008; HEROLD *et al.*, 2013).

Peso, Altura, IMC

Crianças e Adolescentes saudáveis apresentam uma diferença significativa em relação aos diabéticos. O que é esperado, uma vez que o DM1 está frequentemente relacionado com à redução de peso (ADA, 2015; USHER-SMITH *et al.*, 2015).

Histórico Familiar de DM

Dos 90 pacientes entrevistados, 57 (65%) apresentam histórico de familiares com DM1 ou DM2. Vários estudos epidemiológicos revelaram uma associação positivaentre a história familiar de *Diabetes mellitus* e o risco deaparecimento de novos casos tanto de DM1 como de DM2(DAHLQUIST *et al.*, 1989; LI *et al.*, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2001; USHER-SMITH *et al.*, 2015). Ainda, no estudo realizado em 11 hospitais da Inglaterra, 19% dos parentes suspeitou de DM1 antes de se consultar com um profissional, devido ao fato de apresentarem história familiar de DM (USHER-SMITH *et al.*, 2015).

Comorbidades

Dos 90 pacientes, 5 apresentam hipotireoidismo (5,6%), 3 doença celíaca (3,3%),2 obesidade (2,2%) e 17 doença arterial coronariana (19%).

Pacientes com DM1 estão propensos a outras doenças auto-imunes, sendo as mais comuns doença de Graves, tireoidite de Hashimoto e doença celíaca, embora o risco de desenvolvimento em criança seja menor que em adultos (ADA, 2015). Tireoidite auto-imune é a doença mais comum associada com o diabetes, ocorrendo em 17-30% dos pacientes com DM1 (ROLDAN, ALONSO e BARRIO, 1999). Aproximadamente ¼ das crianças com DM1 apresentam auto-anticorpos tireoidianos no diagnótico (TRIOLO *et al.*, 2011), e a presença destes anticorpos é preditivo para doença tireoidiana, sendo o hipotireoidismo mais comum, embora hipertireoidismo também possa ocorrer (KORDONOURI *et al.*, 2002). Contudo, a incidência de doença tireoidiana entre os DM1 (5,6%) neste estudo foi bem menor que o relatado em outros estudos (15-30%) (MANTOVANI, MANTOVANI e DIAS, 2007; KARAVANAKI *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2014), inclusive de brasileiros (RAMOS *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2005; ARAUJO *et al.*, 2008).

A doença celíaca ocorre em torno de 1-16% dos pacientes com DM em comparação à 0,3-1% na população geral (HOLMES, 2002; REWERS *et al.*, 2004).

Na Europa, a prevalência de Doença celiaca entre os diabéticos varia muito entre os diversos países, atingindo até 16,4%, com média de 4,1% (COLLIN P *et al.*, 2002).

No Brasil, os estudos são escassos (BAPTISTA ML *et al.*, 2005, Brandt K G, 2004) e em muitos serviços a investigação da Doença celiaca ainda não foi incorporada à rotina de seguimento dos pacientes com DM1.

Crianças diagnosticadas com DM1 apresentam alto risco precoce de DAC subclínico (HALLER *et al.*, 2004; HORTENHUBER *et al.*, 2013) e clínico (ORCHARD *et al.*, 2001).Estudos realizados no Brasil mostraram que a frequência esperada de DAC para a população saudável é em torno de 6% e para DM1 de 25% (MATHEUS,COBAS e GOMES, 2008). Em nosso estudo a comorbidade encontradacom maior frênquencia foi a doença cardíaca com uma porcentagem em torno de 19 % .

De forma supreendente, o sobrepeso e obesidade são prevalentes atualmente entre os jovens com DM1, e estudo recente demonstrou que jovens com DM1 estão mais propensos a estar acima do peso do que seus pares sem a condição (LIU et al., 2010). O panorama mundial (EATON *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2014; AHLUWALIA *et al.*, 2015) e brasileiro (BRASIL-IBGE, 2010; GUEDES *et al.*, 2013) da obesidade têm se revelado como um novo desafio para a saúde pública, uma vez que sua incidência e sua prevalência têm crescido de forma alarmante nos últimos 30 anos.Inclusive, a ADA (2015) salienta que embora os pacientes com DM1 não sejam tipicamente obesos, a obesidade não deve excluir o diagnóstico. A obesidade nesses pacientes tem sido associada com o aumento das necessidades de insulina, mau controle metabólico (MELIN *et al.*, 2013; ADA, 2015), maior carga aterosclerótica (PURNELL *et al.*, 2013) e aumento da necessidade de hospitalização por insuficiência cardíaca (VESTBERG *et al.*, 2013). Atividade física em pacientes com DM1 resulta em ligeiras reduções tanto nos valores de hemoglobina glicada, como no índice de massa corporal (NIELSEN *et al.*, 2006; CONN *et al.*, 2008).

Auto-anticorpos

Dos pacientes pesquisados 89 (98%) apresentaram positividade para um dos anticorpos testados, sendo que 53,7% apresentaram anti-GAD positivo. Auto-anticorpos anti-GAD e anti-IA2 são considerados importantes marcadores destas alterações, cuja prevalência varia, segundo a população estudada e história familiar (CESARINI *et al.*, 2003).

As taxas depositividadeparaosauto-anticorpos nas ilhotas para o antígeno específico no início daDM1paraindivíduos dapopulação geral que têm sido relatado (WINTER e SCHATZ, 2011) são os seguintes: ICA, 70% a 80%dos indivíduos;IAA, 60% das crianças; IA2, 60% dos indivíduos; e anti GAD,70% a 80% dos indivíduos (ORBAN *et al.*, 2009; WINTER e SCHATZ, 2011). Positividadeadicional para ICAcitoplasmática pode aindapreveramais rápida progressão paraDM1,do queaGADe IA2 prevêm sozinhas (PIETROPAOLO *et al.*, 2005). Cerca de de 90-95% dos pacientes recém diagnosticados com DM1 apresentam pelo menos positividade para pelo menos um anticorpo (CANIVELL e GOMIS, 2014).

5.2. Análises bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos dos diabéticos tipos 1 e controles na amostra em estudo são mostrados na Tabela 2.

Uma significativa diferença na concentração dos biomarcadores de controle glicêmico pode ser observada entre o grupo controle e o grupo DM1 (Tabela 2). Esta esperada diferença confirma os critérios de seleção dos grupos, em especial o grupo controle saudável para o qual é esperado glicemia de jejum dentro de parâmetros normais.

As concentrações médias da glicemia, acima de 180 mg/dL para crianças em idade escolar e acima de 130 mg/dL para adolescentes, a HbA1c>7,5% e o 1,5AG (<10 µg/mL), indicam que o grupo DM1 em estudo contempla diabéticos com mau controle metabolico (Tabela 2). As concentrações destes biomarcadores, suplantam os valores de corte supracitados, preconizados para caracterizar bom controle glicêmico, nos principais *guidelines* atuais (SBD, 2012; VAN LEEUWEN, POELHUIS-LETH e BLADH, 2013; ADA, 2015).

Tabela 2 . Parâmetros bioquímicos dos diabéticos tipos 1 e controles na amostra em estudo.

Parâmetros	Controle (n=105)	DM1 (n=90)	P
Glicemia ao acaso (mg/dL)	85,2±10,1	281±118	**<0,001**
HbA1C	5,3(5,2-5,5)	10,2(9,3-11,5)	**<0,001***
1,5 anidrogucitol(µg/mL)	29,5(24,9-34,7)	2,3(1,5-3,4)	**<0,001***
Colesterol total (mg/dL)	143,9±23,8	179,3±42,9	**<0,001**
HDL-C (mg/dL)	49,1±10,1	55,2±12,7	**<0,001**
LDL-C (mg/dL)	76,5±22,6	106,4 ±34	**<0,001**
Triglicérides (mg/dL)	77(61-112)	69(56-100)	0,209*
Colesterol não-HDL (mg/dL)	94,9±24,2	124,1 ±39,2	**<0,001**
Proteína Total (g/dL)	7,2±0,6	7,2±0,45	0,666
Albumina (g/dL)	4,1(4-4,4)	4,2(4-4,4)	0,960*
Ácidoúrico (mg/dL)	4,0±1	3,2±1	**<0,001**
Uréia (mg/dL)	20,2±4,7	28,8±7,4	**<0,001**
Creatinina (mg/dL)	0,52(0,32-0,7)	0,75(0,6-0,8)	**<0,001***

Os valores são média ±DP, mediana (intervalo interquartil)
P, probabilidade com o teste t-Student.*Mann-Whiteney
P<0,05 é significativo
Fonte: O autor (2015)

Biomarcadores de Controle Glicêmico (glicemia jejum, HbA1C e 1,5AG)

O controle glicêmico é particularmente difícil em crianças e adolescentes, devido às alterações na sensibilidade à insulina relacionadascom a maturidade sexual e o crescimento físico (FRANZESE, VALERIO e SPAGNUOLO, 2004), a capacidade para prestar o auto-cuidado e a supervisão na educação pelos pais e escola (GALE, 2005; ADA, 2015), acrescidos à maior dificuldade no controle glicêmico com uso de insulina usual em todos os pacientes DM1 (ROSENSTOCK, 2001).O adequado controle glicêmico é essencial para evitar ou minimizar as complicações associadas à patologia (DCCT, 1993; WHITE *et al.*, 2001; NATHAN *et al.*, 2005).

Um estudo realizado por Campbell e colaboradores (CAMPBELL *et al.*, 2014) avaliou o controle glicêmico de crianças entre 6-17 anos em 58 clínicas de diabetes nos Estados Unidos, com excelente controle glicêmico (HbA1c<7,5%) e com mau controle glicêmico (HbA1c>9,0%). O número de crianças com mau controle (n=2684) foi 4,6 vezes maior do que com bom controle (n=588). Os autores observaram que a diferença era devida às técnicas de auto-monitoramento utilizadas pelas crianças. As crianças com excelente controle utilizavam bombas de insulina, realizavam controle glicêmico ≥ 5 vezes ao dia, esqueciam menos de aplicar a insulina basal,

aplicavam insulina basal antes das refeições e não no momento ou após as refeições, utilizavam insulina refeição específica: taxa de carboidrato, checavam a glicemia antes de administrar a insulina antes da refeição, admistravam insulina para o lanche, administravam mais insulina basal e utilizavam uma dosagem média total de insulina menor que as crianças com mau controle. Após o ajuste para fatores demográficos e socio-econômicos, as características do monitoramento do diabetes ainda foram fortemente associadas com bom controle versus mau controle. Notavelmente, a frequência de hipoglicemia severa foi similar entre os dois grupos, enquanto que a cetoacidose foi mais comum no grupo pobremente controlado.

Perfil Lipídico

Crianças DM1 com pobre controle glicêmico estão propensas à anormalidades lipídicas (PETITTI *et al.*, 2007), como apresentado no grupo em estudo (Tabela 2).

Os pacientes DM1 apresentaram valores maiores de Colesterol total, HDL-C e LDL-C e menores de triglicerídeos quando comparado com o grupo controle, um perfil de alteração esperado em pacientes DM1 nesta faixa etária (GUY *et al.*, 2009).

Crianças com DM1 apresentaram maiores concentrações de HDL-C de forma consistente ($p<0,001$) e paradoxalmente maiores que o grupo controle, contudo esse achado, já foi relatado em outros trabalhos (MAAHS *et al.*, 2005; GUY *et al.*, 2009; SNELL-BERGEON *et al.*, 2010; KRISHNAN *et al.*, 2011).

O perfil lipídico aterogênico apresentado pelo grupo DM1, coloca estas crianças em maior risco para doença cardiovascular (DE FERRANTI *et al.*, 2014). Embora os pacientes com DM1 apresentem valores de HDL-C normais à elevados, sofrem de eventos cardiovasculares inapropriadamente elevados (LAING *et al.*, 1999; LIBBY *et al.*, 2005). Foi mostrado que a sub classe em particular da HDL está associada com risco cardiovascular (VALABHJI *et al.*, 2002; SOEDAMAH-MUTHU *et al.*, 2003). Adicionalmente, o procesamento do HEME em pacientes DM1 pelo genótipo haptoglobina 2-2 deixa estes complexos menos capazes de serem removidos pelos macrófagos, permitindo que se associem à HDL, o que as tornam menos funcionais (ASLEH et al., 2006). Dados do estudo EDC (*Epidemiology of Diabetes Complications*) sugerem que a associação inversa usual entre HDL e risco

para DAC, embora mantida em homens, está alterada em mulheres com DM1, que mostram pouca proteção com concentrações acima de 50-60 mg/dL (COSTACOU, EVANS e ORCHARD, 2011). Embora evidências epidemiológicas do mesmo estudo citado anteriormente sugiram que LDL>100 mg/dL está associado com aumento do risco para DAC (ORCHARD *et al.*, 2001), e um estudo de meta análise da diminuição de LDL que incluiu pacientes DM1 sugere que a redução do LDL reduz o risco para DAC (embora em taxas muito reduzidas para ser definitivo) (CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS, 2010).

Proteínas (Proteínas Totais e Albumina)

As concentrações das proteínas totais e albumina não mostraram diferenças significativas (p=0,666 e p=0,960, respectivamente) entre os grupos (Tabela 2). Em análise global os pacientes com DM1 não apresenta sinais de perda protéica importante ou deficiência nutricional.

Ácido úrico

A concentração sérica de ácido úrico foi significativamente menor (p<0,001) nos grupo com diabetes quando comparado ao controle saudável (Tabela 2). Tem sido descrito que pacientes com DM1 podem apresentar hipouricemia (SHICHIRI, IWAMOTO e SHIIGAI, 1987; ESPARZA MARTIN e GARCIA NIETO, 2011).

Esta redução da concentração plasmática de urato é devida a um aumento no *clearance* (depuração) renal deste analito associado à glicosúria por mecanismo que permanece desconhecido (SHICHIRI, IWAMOTO e SHIIGAI, 1987; ERDBERG *et al.*, 1992; GOLIK *et al.*, 1993). Esta hipouricemia foi observada em pacientes com taxa de filtração glomerular normal.Entretanto não se sabe se um controle glicêmico adequado poderia normalizar a excreção do acido úrico(GOLEMBIEWSKA *et al.*, 2005).

Uréia e creatinina

Uréia e creatinina são marcadores de filtração glomerular, consequentemente da função renal (FERGUSON e WAIKAR, 2012). O grupo DM1 apresentou

concentrações médias destes marcadores significativamente maiores em relação ao grupo controle (Tabela 2). Este resultado era esperado uma vez que entre as complicações mais frequentes associadas ao DM1 está a lesão renal (REDDI e CAMERINI-DAVALOS, 1990). A nefropatia no *Diabetes mellitus* é progressiva e associada ao mau controle glicêmico (MURUSSI *et al.*, 2007)**.**

5.3. Avaliação do 1,5 anidroglucitol

Para o estudo da avaliação do 1,5AG, o tamanho amostral do grupo controle foi aumentado e sub-classificado para a proposição dos intervalos de referência para crianças e adolescentes saudáveis. Primeiramente foi feita uma análise estatística para detecção de *outliers*(valores atípicos), (Figura 7). Foram removidos 4*outliers*no grupo das crianças saudáveis**.** Esse estudo é importante para a consistência dos intervalos de referência. Dois pacientes do grupo DM1 foram identificados como *outlier*se apresentaram um melhor controle glicêmico comparado à grande maioria do grupo, mas ainda considerado mau controle por apresentarem valores de 1,5AG < 10 μg/mL.

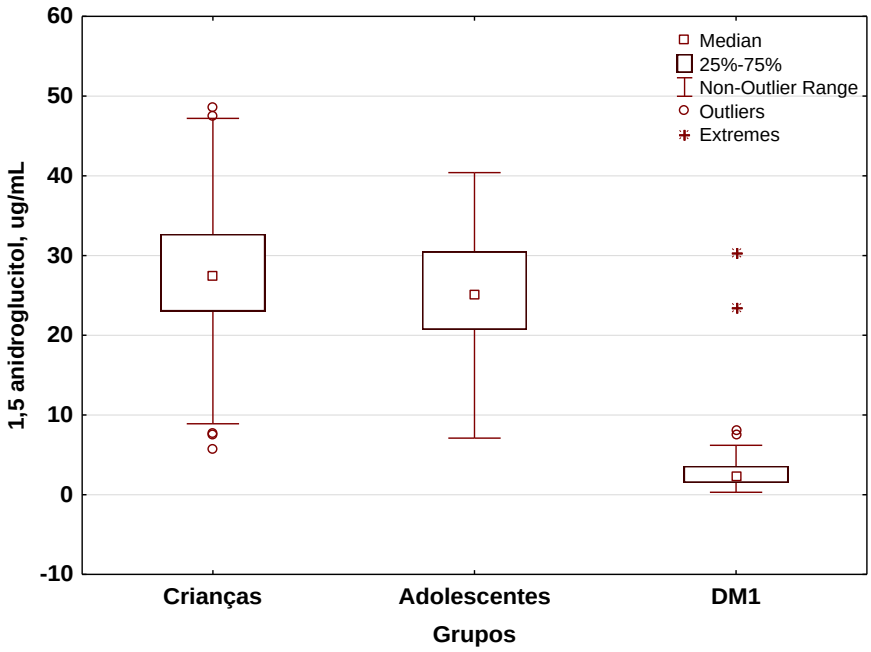


Figura 7 Pesquisa de outliers para 1,5 anidroglucitol (1,5AG). Busca de *outliers* para 1,5AG nos grupos em estudo. Os valores são medianas e as caixas representam 25%-75% da distribuição. As barras verticais indicam o limite sem *outliers*. Os asteriscos representam valores extremos e as circulos abertos sem preenchimento os *outliers*. Programa: Statistica Outliers 2D Box Plots
Fonte: O autor (2015)

Após a remoção dos *outiliers* no grupo de crianças saudáveis, foi feita análise estatística descritiva dos grupos em estudo, incluindo média, desvio padrão, mediana, amplitude de variação e frequência (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização da amostra para estudo de avaliação do 1,5AG

Parâmetros	Crianças n=375	Adolescentes n=246	DM1 n=90	P
Idade (anos)	10,1±0,85	14,6±1,2	12(10-13)	<0,001
Gênero (H/M; %)	39/61	39/61	50/50	0,118*
1,5 anidroglucitol (µg/mL)	27,9±7,4	25,4±6,9	2,3(1,5-3,4)	<0,001

Gênero, H, homens; M, mulheres
Os valores são média ±DP, mediana (intervalo interquartil) ou frequências (HTTP://EN.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/RAGE_%28RECEPTOR%29).
Comparações com teste não-paramétrico (Kruskall-Wallis) ou teste do *Chi-quadrado
Crianças e adolescentes saudáveis, comparações com teste t-Student, idade (P<0,001) e 1,5AG (P<0,001).
Fonte: O autor (2015)

Os pacientes com DM1 apresentaram uma idade mediana intermediária (12 anos) entre os grupos controle de crianças e adolescentes (Tabela 3). Os grupos controles apresentaram prevalência do sexo feminino.

As concentrações de 1,5 anidroglucitol apresentaram diferenças entre os grupos controles de adolescentes e de crianças (P<0,001) e apresentaram valores superiores aos encontrados em outros estudos com uma população adulta, como 16 a 28 µg/mL (KAMETANI *et al.*, 1987); 17 a 32 µg/mL (YAMANOUCHI *et al.*, 1991); 16 a 32 µg/mL (ROBERTSON *et al.*, 1993); 13 a 24 µg/mL (LI *et al.*, 2008); 16 a 27 µg/mL (JANUSZEWSKI *et al.*, 2012), evalores inferiores e em intervalo mais estreito (8,9–44,5 µg/mL) que os encontrados numa população que avaliou jovens e jovens adultos (20,4±5,2, dentro de um intervalo entre 10,6–30,5)(MEHTA *et al.*, 2012). Em uma população entre 12-18 anos foi relatado valores de 15,6 a 29,2, µg/mL, e os próprios autores acreditam que isto foi devido ao pequeno número amostral (n=11) utilizado (NGUYEN *et al.*, 2007). Estas diferenças podem se dever à idade avaliada neste estudo ser bem inferior (11,8 anos) ao dos outros estudos (Tabela 3). Em concordância com esta hipótese, Mehta e colaboradores (2012) reportaram que a maioria dos indivíduos saudáveis em seu estudo que apresentaram concentrações de 1,5AG >32 µg/mL encontravam-se em uma faixa etária inferior aos 20 anos.

A concentração média do 1,5AG foi significativamente diferente entre os grupos controle e DM1, sendo que o grupo DM1 apresentou uma concentração cerca de 11 a 12 vezes menor a do que o grupo controle saudável (Tabela 3).

A Figura 8 mostra a distribuição do 1,5 Anidroglucitol entre os grupos de crianças e adolescentes saudáveis e pacientes com DM1. No grupo controle saudável (crianças e adolescentes), a distribuição da concentração de 1,5AG se aproxima da distribuição normal (curva de Gauss), enquanto nos diabéticos tipo 1, a distribuição não é normal. Esta distribuição para diabéticos tipo 1 recomenda o uso de intervalo de referência com base em análises não-paramétricas como preferenciais.

Os pacientes DM1 apresentaram valores de 1,5AG deslocados para esquerda devido ao efeito da sua redução pela hiperglicemia presente. Esta característica reforça que estes pacientes apresentam frequência elevada de excursões hiperglicêmicas (picos de hiperglicemia), o que é compatível com usuários de insulina exógena. Neste grupo a dificuldade de maior rigor no controle glicêmico está atrelada ao uso das insulinas exógenas, que não reproduzem a homeostasia do sistema fisiológico normal (MEDICA, 2005).

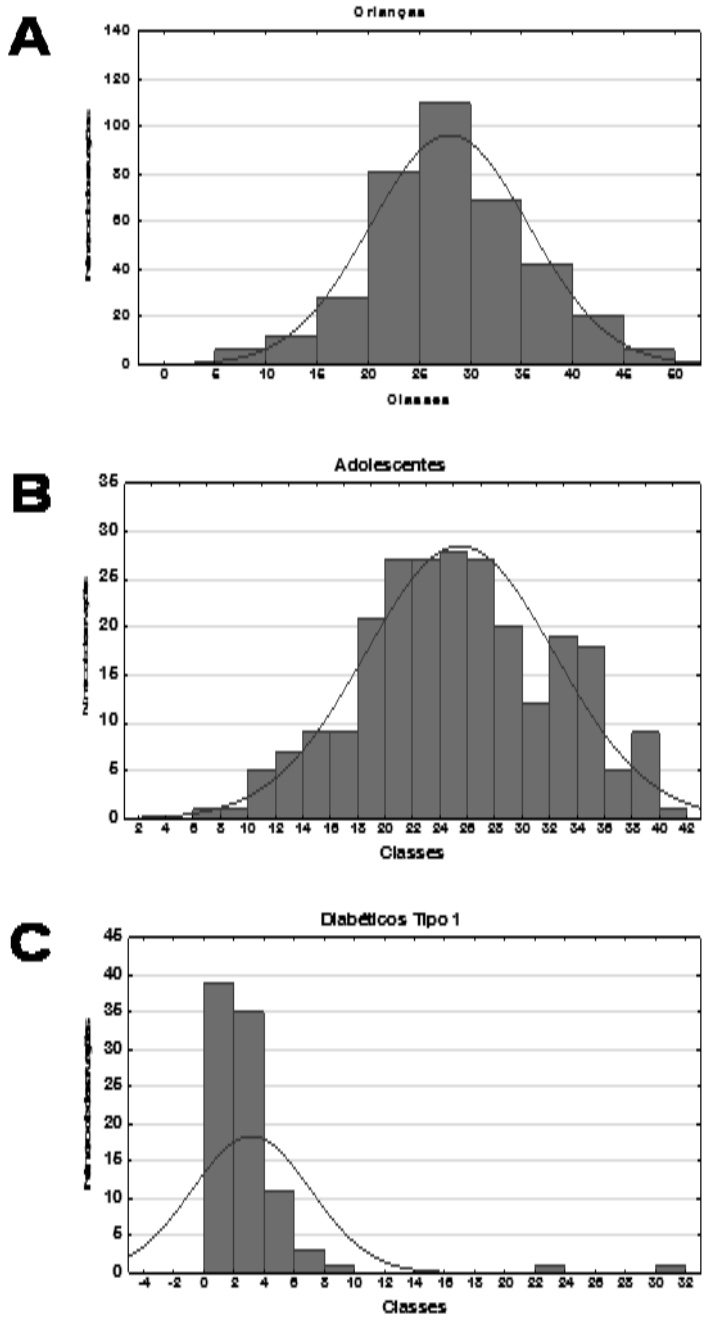


Figura 8 Histogramas da distribuição do 1,5 anidroglucitol nos grupos em estudo. Distribuição das concentrações de 1,5 anidroglucitol e teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov (KS). Painel A. Crianças (n=375; K-S p>0,20). Painel B. Adolescentes (n=246; K-S p>0,20). PainelC. Diabéticos tipo 1 (n=90; K-S p<0,01). A linha preta em todas as figuras mostra a distribuição normal esperada.
Fonte: O autor (2015)

Em concordância com os nossos resultados, outros estudos mostraram que as concentrações de 1,5AG são consistentemente e marcadamente diminuídas em pacientes diabéticos tipo 1 (valores médios entre 0,98-1,97 µg/mL)(PITKÄNEN, 1982; YAMANOUCHI, 1987; YAMANOUCHI *et al*., 1992; JANUSZEWSKI *et al*., 2012). As concentrações de 1,5AG são menores em pacientes que já apresentam as

complicações do DM e realizam tratamento com insulina (UMEDA *et al.*, 1991; BORITZA, 2012; MEHTA *et al.*, 2012). Esta baixa concentração de 1,5AG demonstra que o grupo DM1 está sujeito a maior frequência de eventos de hiperglicêmicos (incursões hiperglicêmicas) e consequentemente apresentam maior dificuldade no rigor do controle glicêmico (KIM, WON JUN e PARK 2013).

As concentrações de 1,5 anidroglucitol apresentaram diferenças entre gêneros (Figura 9). Nos grupos dos adolescentes e crianças, pode se observar valores de 1,5AG maiores em meninos do que meninas. Um estudo em crianças conduzido por Nguyen e colaboradores (2007) mostrou que não havia diferença entre o gênero na ausência de diabetes para o 1,5AG sérico (homens 24,57±5,01 µg/mL *vs*. mulheres 24,65±2.44 µg/mL, p=0,98), contudo os própios autores chamam atenção para o baixo número amostral avaliado (n=11), e acreditam ter sido esta a razão que impediu a detecção da diferença entre os gêneros. Mas estudos conduzidos em população adulta reportaram esta diferença nas concentrações entre os gêneros masculino e feminino, onde os homens apresentaram concentrações superiores às mulheres (YAMANOUCHI *et al.*, 1992; YAMANOUCHI e AKANUMA, 1994; MCGILL *et al.*, 2004; NOWATZKE *et al.*, 2004; JANUSZEWSKI *et al.*, 2012). Além disso, Mehta e colaboradores (2012) ao analisarem controles saudáveis com idades $\leq$18 e >18 anos observaram que os homens tiveram valores significativamente mais altos de 1,5AG quando comparado com as mulheres e essa diferença permaneceu significativa após o controle por idade e HbA1c.

Contudo, esta diferença entre os gêneros não foi observada no grupo DM1, que concorda com o estudo de Nguyen e colaboradores (NGUYEN *et al.*, 2007) conduzido com crianças e diverge de estudos conduzidos em adultos e jovens adultos (BORITZA, 2012; MEHTA *et al.*, 2012). Nguyen e colaboradores (2007) mostraram com um pequeno número (n=11) amostral que não havia diferença entre o gênero na presença de DM1 (homens 4,56±3,21 µg/mL *vs* mulheres 5,20±2,80 µg/mL, p=0,77).As concentrações médias de 1,5AG em mulheres com DM1 foram significativamente menores (3,5 µg/mL) quando comparadas a homens (10,4 µg/mL), em razão de cerca de 3 vezes no estudo desenvolvido por Boritza e colaboradores (2012).

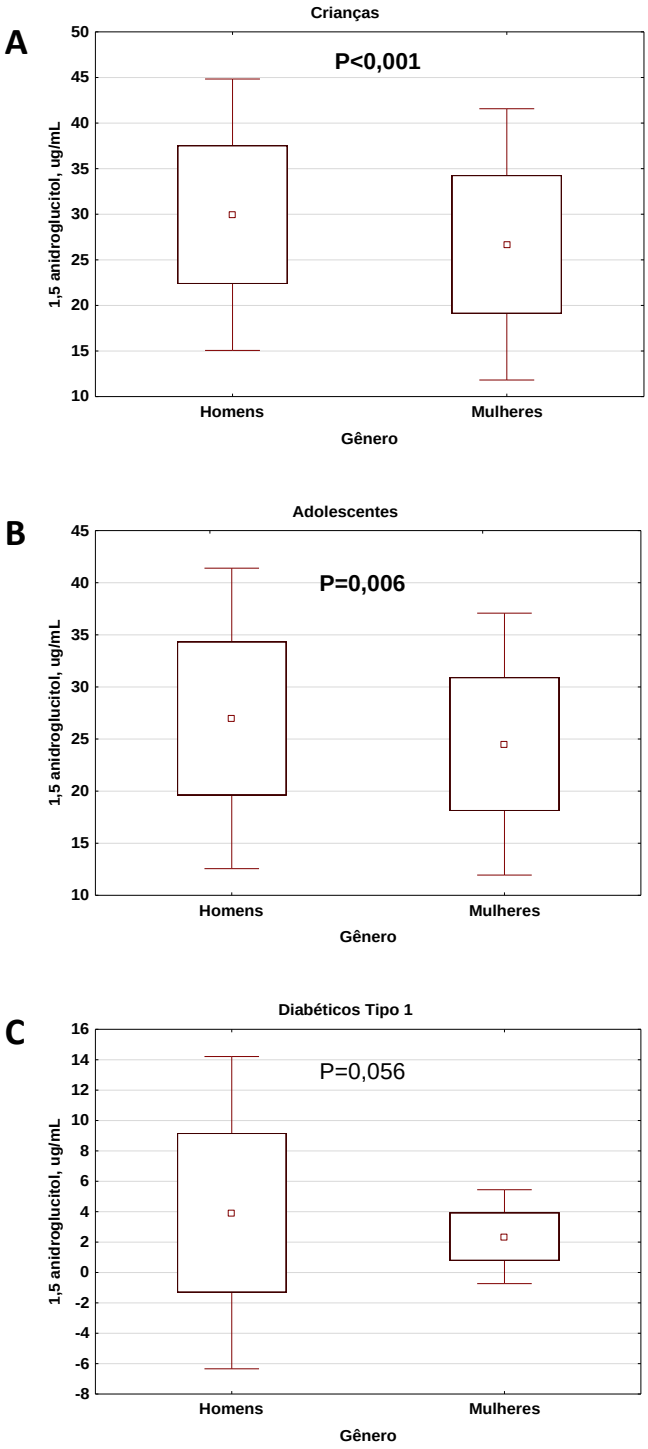


Figura 9.Comparações entre as concentrações de 1,5AG e gênero nos grupos em estudo. Comparações com o teste t-Student entre gêneros (homens e mulheres) foram realizadas para os grupos de crianças (Painel A), adolescentes (Painel B) e diabéticos tipo 1 (PAinel C). Valores de probabilidade significativos estão destacados em negrito.
Fonte: O autor (2015)

Mehta e colaboradores (2012) mostraram uma diferença significativa (p=0,003) entre o sexo feminino (3,4±1,6 µg/mL; com intervalo de 1,0-9,5 mg/mL) e masculino (4,5±2,3 µg/mL; com intervalo de 1,1-11,1 µg/mL), contudo a diferença

observada por estes autores não foi tão expressiva como as obtidas no outro estudo. Contudo, um estudo conduzido por Ouchi e colaboradores (2012) mostrou que a diferença na concentração do 1,5AG entre os gêneros vai desaparecendo com o aumento da HbA1c.

As diferenças entre as concentrações de 1,5AG entre os gêneros poderia ser devido às diferenças na produção de urina ou do limiar renal para glicose. Mudanças na água corporal e perfis de composição do eletrólito e hormônios sexuais entre homens e mulheres, sendo que ambos podem afetara regulação da produção de urina (MAHLER *et al.*, 2013). Foi mostrado que mulheres apresentam um limiar renal maior para a glicose que os homens (OUCHI *et al.*, 2012).

De forma geral crianças de ambos os sexos têm uma concentração significativamente maior de 1,5AG, tanto em homens como em mulheres quando comparado com os adolescentes (Figura 10). Outros estudos também abordaram o efeito da idade em grupos saudáveis.Em quatro destes estudos as diferenças não foram significativas (YAMANOUCHI *et al.*, 1988; TSUKUI, FUKUMURA e KOBAYASHI, 1996; MCGILL *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2008). Um deles achou correlação negativa significativa com a idade em homens saudáveis, mas não em mulheres (FUNASAKO *et al.*, 1994). Em um estudo mais recente foi mostrado que a idade foi negativamente correlacionada com as concentrações de 1,5AG em ambos os sexos (OUCHI *et al.*, 2012).

Diferença idade-específicas nas concentrações de 1,5AG podem estar relacionadas ao limiar renal para a glicosúria, que varia com a idade na ausência de diabetes ou doença renal subjacente, e especialmente em mulheres (BUTTERFIELD, KEEN e WHICHELOW, 1967; KILPATRICK *et al.*, 1999). Em jovens, as concentrações de 1,5AG podem estar relacionadas às diferenças do *timing* e do *status* puberal, um período de resistência relativa à insulina (NGUYEN *et al.*, 2007; MEHTA *et al.*, 2012).

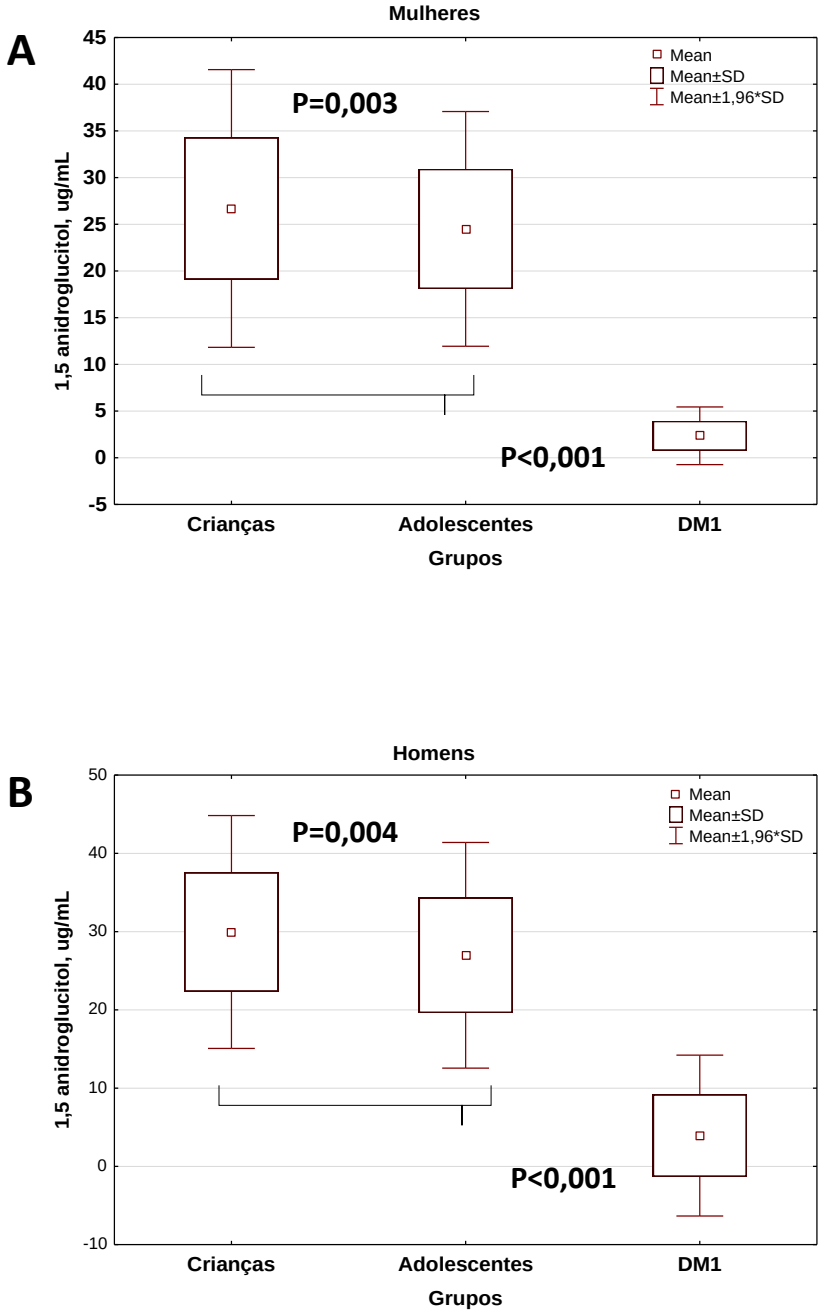


Figura 10. Comparação entre os grupos em estudo (ANOVA).A concentração de 1,5AG foi comparada entre os grupos, de acordo com o gênero (Painel A, mulheres e Painel B, homens) em estudo com análise de variância (ANOVA). Os pontos representam a média, o quadrado um desvio padrão e as barras verticais 2 desvios padrão. Os valores de Probabilidade (teste t-Student) na parte superior relacionam crianças *vs* adolescentes, e na parte inferior entre crianças e adolescentes *vs* DM1. Em ambos os gêneros a ANOVA com os três grupos apresentou P<0, 001.
Fonte: O autor (2015)

Outra explicação possível seria o aumento da taxa de eliminação do 1,5AG devido à disfunção renal relacionada com o envelhecimento, associado à redução da ingestão alimentar de 1,5AG, o que levaria à redução do 1,5AG (FUNASAKO*et al.*, 1994), ou poderia estar relacionado com o aumento da glicemia com o

envelhecimento (DAVIDSON, 1979). Contudo, a redução do 1,5AG com a idade não pode ser explicada somente pelo aumento da prevalência da intolerância à glicose com a idade. E embora, a diminuição das concentrações de 1,5AG sejam observadas com insuficiência renal (SERVO, PALO e PITKANEN, 1977; EMOTO *et al.*, 1992), a excreção renal de 1,5AG não é afetada por doença renal branda (YAMANOUCHI *et al.*, 1988). Já Ouchi e colaboradores (2012), que demonstraram associação negativa entre 1,5AG e a idade, e que as concentrações de 1,5AG gênero dependente vão diminiuindo com a idade, acreditam que deveriam ser consideradas diferenças na ingestão calórica que ocorre entre os mais jovens e idosos e entre homens e mulheres. Estes autores acreditam que uma possível exlicação para a diminuição das concentrações do 1,5AG com a idade é o efeito da ingestão calórica. O 1,5AG origina-se principalmente pela dieta e é bem absorvido pelo intestino (YAMANOUCHI *et al.*, 1992). A ingestão média diária total de alimentos enegéticos diminui com a idade em ambos os sexos, mas permanece mais alta em homens do que em mulheres (CENTERS FOR DISEASE PREVENTION, 1994). Dados do NHNES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) no Japão também indicam que a média de ingestão calórica e diferenças entre ingestão calórica entre os sexos diminui com a idade (NATIONAL HEALTH AND NUTRITION EXAMINATION SURVEY, 2007).

O uso do 1,5AG na triagem do diabetes é de interesse porque este biomarcador apresenta característica de modificação rápida (1-3 dias) à hiperglicemia. No entanto, sua aplicação neste contexto é controversa. Yamanouchi e colaboradores (1991) e Robertson e colaboradores (1991), concluíram que o 1,5AG é suficientemente sensível e específico para o diagnóstico do diabetes, enquanto Robertson e colaboradores (ROBERTSON *et al.*, 1993) apontam em sentido contrário. Em estudo multicêntrico Yamanouchi e colaboradores (1991) avaliaram 342 indivíduos com tolerância normal à glicose comparados a 460 pacientes diabéticos. Neste estudo, o ensaio de 1,5AG apresentou 84% de sensibilidade e 93% de especificidade como discriminador do diabetes, com valor de corte de 14 µg/mL.

Para avaliar se o 1,5AG poderia discriminar o grupo controle do grupo diabético, foi feita a Curva da Característica de Operação do Receptor (ROC-*Receiver Operating Characteristic*), mostrada na figura 11.

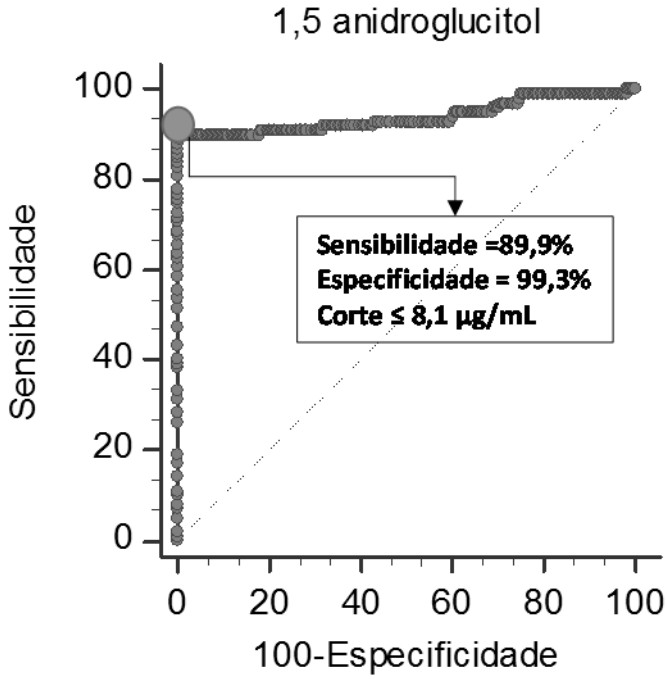


Figura 11.Curva da Característica de Operação do Receptor (ROC) para crianças e adolescentes saudáveis e com DM1.A Curva da Característica de Operação do Receptor (ROC) comparando crianças e adolescentes saudáveis (n=613) e com DM1 (n=90) apresentou área sob a curva = 0,936 (P<0,001). A concentração de 1,5AG de melhor discriminação (Younden index) foi ≤8,1 µg/mL com sensibilidade = 89,9% e especificidade = 99,3% (em destaque na figura).
Fonte: O autor (2015)

A concentração de corte de 1,5AG de 8,1 µg/mL discriminou o grupo DM1 de controles saudáveis com sensibilidade de 89,9% e especificidade de 99,3%. Portanto, pacientes com DM1 podem ser identificados pela determinação de 1,5AG. Novos estudos com maior tamanho amostral serão necessários para validar o efeito discriminante do 1,5AG em pacientes com DM1.

Finalmente, analisando os resultados do 1,5AG para os pacientes saudáveis em crianças e adolescentes, foi estabelecido para a população em estudo valores de referência (Tabela 4). As concentrações de1,5AG foram separadas por gênero e os intervalos de referência foram descritos como a média ±2 desvios padrões (95% dos dados) ou como o intervalo entre o percentil 2,5 e 97,5% (95% dos dados) em distribuição que não segue a normalidade.

Neste estudo as concentrações de 1,5 anidroglucitol apresentam diferenças entre gêneros e idade, sugerindo que o intervalo de referência para as crianças e e adolescentes deve ser separado (Figuras 9 e 10).Os intervalos de referência expressos em percentis para a população americana foram 5,9-31,8 µg/mL para

homens e 10,2-33,8 µg/mL para mulheres (NOWATZKEet al., 2004), sendo estes valores inferiores ao da população japonesa (12,2-41,0 µg/mL para homens e 9,5-33,5 µg/mL para mulheres).

Tabela 4 .Intervalo de referência para 1,5 anidroglucitol em crianças e adolescentes.

Grupos	Gênero	Intervalo de Referência (µg/mL)			
		Distribuição normal	Não-paramétrica	Método robusto	Max-Min
Crianças					
n=145	Homens	15,1-44,8	15,0-45,4	14,2-44,6	11,2-48,6
n=230	Mulheres	11,8-41,6	9,0-41,4	11,9-41,9	5,7-47,6
	Total	11,8-43,1	10,9-39,2	12,4-41,8	5,7-48,6
Adolescentes					
n=96	Homens	12,6-41,4	11,4-39,2	12,4-41,8	9,6-40,4
n=150	Mulheres	11,9-37,1	11,5-38,3	11,7-37,1	7,1-39,8
	Total	12,0-38,9	11,6-39,0	11,8-39,1	7,1-40,4
Crianças + Adolescentes					
	Total	12,2-41,7	11,4-42,2	12,1-41,7	5,7-48,7

O intervalo de referência é apresentado de três formas: distribuição normal, análise não-paramétrica e o método “robusto” indicado para tamanhos amostrais pequenos. O cálculo foi realizado com o software MedCalc, que utiliza as recomendações do CLSI*C28-A3.
Total representa os resultados obtidos com a combinação de homens e mulheres ou crianças e adolescentes. Em todas as análises apresentadas a normalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk foi aceita.
Fonte: O Autor (2015)

A população brasileira apresentou um intervalo intermediário (9,1-40,3 µg/mL para homens e 6,9-36,4 mg/mL para mulheres) quando comparada com as populações anteriores, mas com uma maior amplitude de variação (BORITZA, 2012). Estudos conduzidos em população mais jovem encontraram um intervalo entre 14,5-37,3 µg/mL em ≤18 anos e entre 8,7-36,3 µg/mL em >18 anos (MEHTA *et al.*, 2012). E um estudo conduzido com crianças e adolescentes entre 12-18 anos encontrou 15,6-29,2 µg/mL para homens e 22,9-28,2 µg/mL para mulheres(NGUYEN *et al.*, 2007). Os valores relatados na literatura se encontram mais próximos ao grupo do adolescentes e inferior ao grupo das crianças.

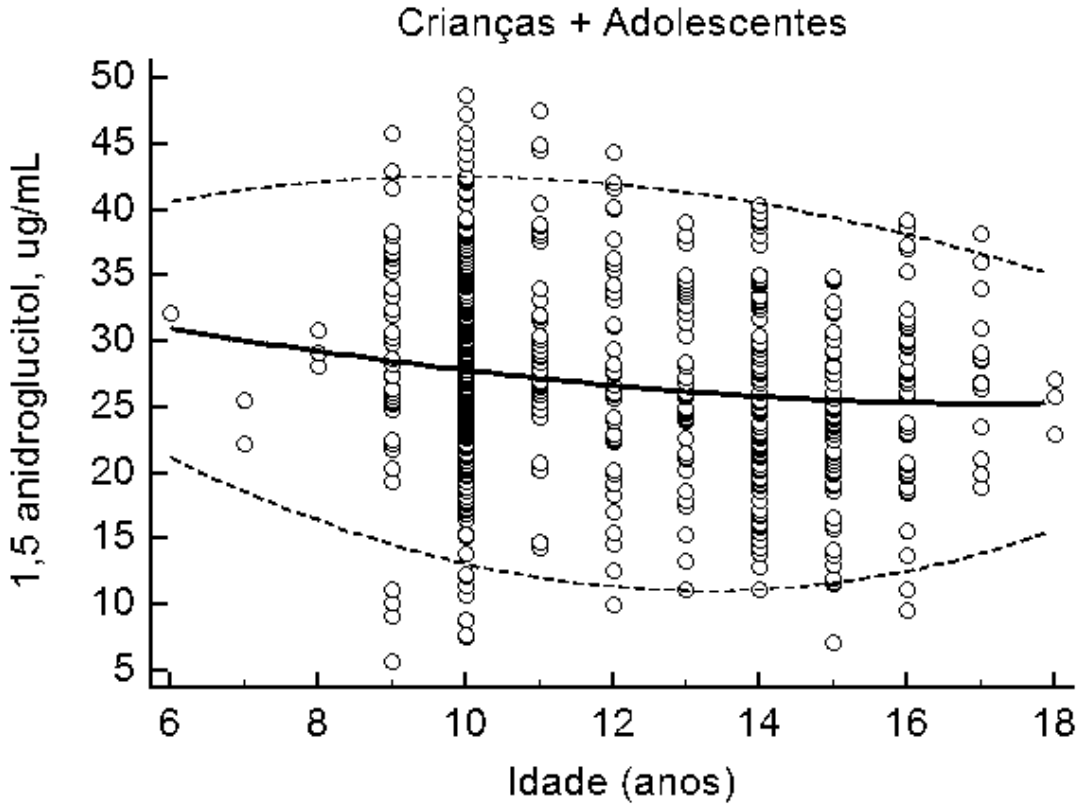


Figura 12. Intervalo de referência para a concentração sérica de 1,5 anidroglucitol em relação à idade em crianças e adolescentes saudáveis.Concentrações séricas de 1,5AG (µg/mL) para crianças e adolescentes saudáveis com idade de 6 a 18 anos, combinando os gêneros (n=621), foram analisados com o software MedCalc. A linha cheia central representa a reta de regressão e as linhas tracejadas o intervalo com percentil 0, 025-0, 975 e os círculos abertos o numero amostral por idade.
Fonte: O autor (2015)

A evolução das concentrações de 1,5AG com o incremento da idade está mostrado na Figura 12. A reta de regressão indica uma redução da concentração sérica de 1,5AG de cerca de 6 µg/mL entre 6 e 18 anos de idade. Temos como hipótese que a alteração do fluxo renal, que também se modifica com a idade, seja a causa precípua desta variação.

Com isso propomos valores de referência que devem ser separados por genêro e faixa etária

5.4 ANÁLISES MOLECULARES

Vários polimorfismos no gene RAGE foram identificados e tem sido associado com as complicações diabéticas (GONZALEZ *et al.*, 2013). A ativação de RAGE é o mediador chave das complicações vasculares no DM1 (GOLDIN *et al.*, 2006; SORO-

PAAVONEN *et al.*, 2008; THOMAS *et al.*, 2011). Devido ao fato de variantes funcionais na região promotora de RAGE exercerem efeitos significantes na atividade transcricional (HUDSON *et al.*, 2001a), podem afetar a susceptibilidade genética da doença cardivascular. Os alelos menos frequentes dos polimorfismos -429C, -374A e Del 63 pb determinaram um aumento na expressão da proteína RAGEde 2-, 3- e 4 vezes, respectivamente, em ensaios *in vitro* (HUDSON *et al.*, 2001b). Estes autores propõem que os sítios mutados dos referidos polimorfismos com base em estudos de EMSA (*Eletrophoretic Mobility Shift Assay*) diminuem a afinidade de um repressor transcricional, o que promove maior expressão da proteína RAGEe consequentemente de seus efeitos fisiológicos.

5.4.1. Detecção dos polimorfismos -429T>C, -374T>A e Del 63 pb do promotor do gene RAGEpor PCR-RFLP

A figura 13 mostra um perfil eletroforético típico do produto de PCR obtido para região promotora do gene RAGE.

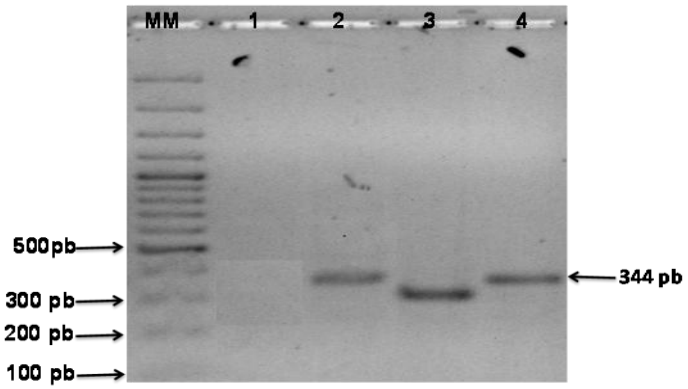


Figura 13.Eletroforese do produto de pcr do promotor do gene RAGE. Na primeira coluna: marcador de massa (MM) de 100pb; na linha 1: branco da reação, sem adição de amostra; e linhas 2 a 4: amostras amplificadas. À direitado gel está indicada a massa molecular do fragmento (344pb) e à esquerda três fragmentos do marcador de massa de 500 pb, 300 pb e 100 pb.
Fonte: O autor (2015).

As Figuras 14 e 15 mostram os perfis eletroforéticos típicos obtidos da PCR-RFLPpara os polimorfismos do promotor do gene RAGE.

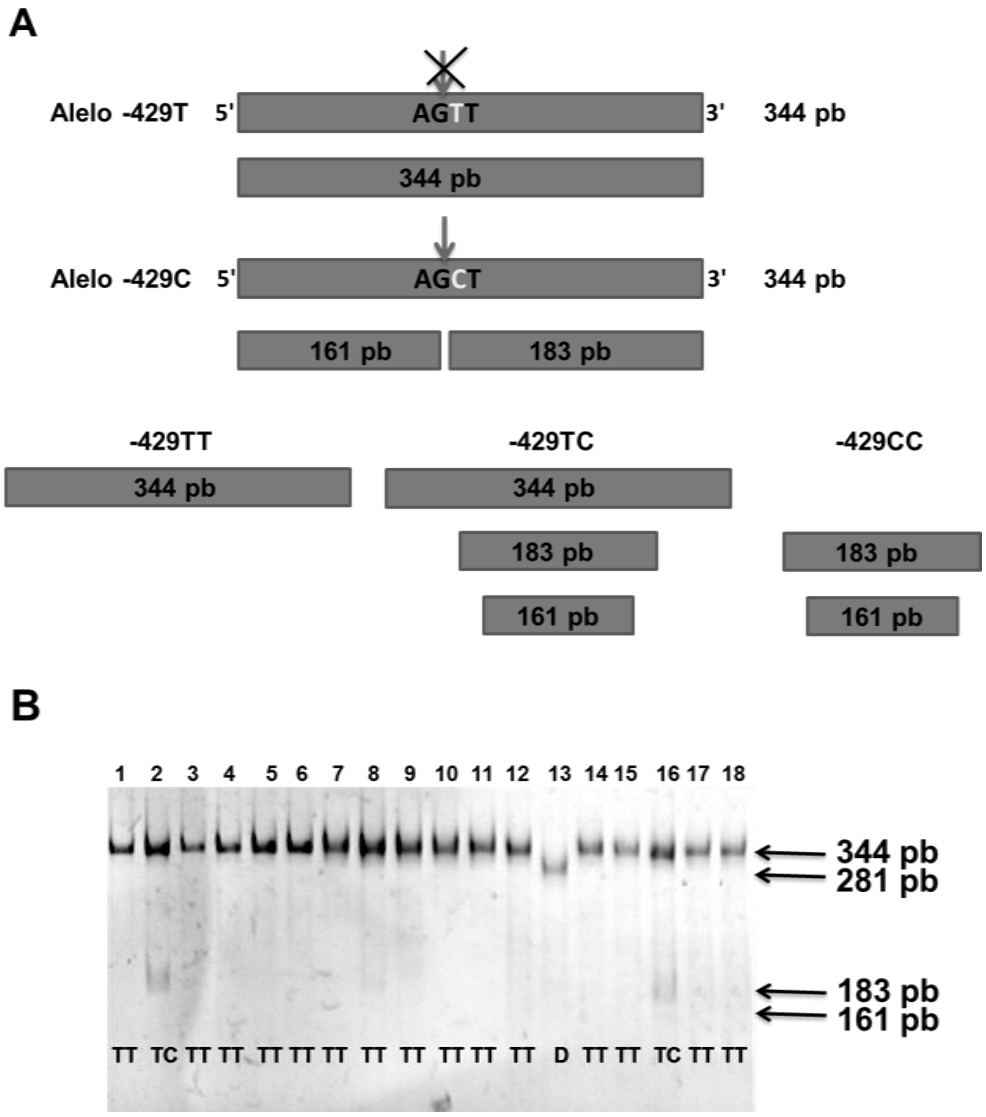


Figura 14. Genotipagem por RFLP do polimorfismo -429T/C. Painel A. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *Alu* I. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se na posição -429. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo selvagem -429T. Quando o alelto T está presente no fragmento de 344 pb nãoocorre digestão com a enzima de restrição *Alu* Inão havendo geração de fragmentos e quando o alelo C está presente são gerados os fragmentos de 183 pb e 161 pb. Assim, o indivíduo homozigoto TT apresenta 1 fragmento de 344 pb correspondente ao fragmento gerado pela PCR; o heterozigoto TC3 fragmentos (344 pb, 183 pb e 161 pb) e o homozigoto CC com dois fragmentos (183 pb e 161 pb). Painel B. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -429T>C da região promotora do gene RAGE. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). As linhas 1 ao 18 mostram respectivamente, os perfis de restrição para os genótipos -429TT,-429TC, -429TT, -429TT, -429TT, -429TT, -429TT, -429TT, -429TT, -429TT, -429TT, -429TT, Del 63 pb, -429TT, -429TT, -429TC, -429TT e -429TT. O fragmento de 281 pb é a presença da deleção de 63 pb em homozigose (Del 63 pb).Fonte: O autor (2015).

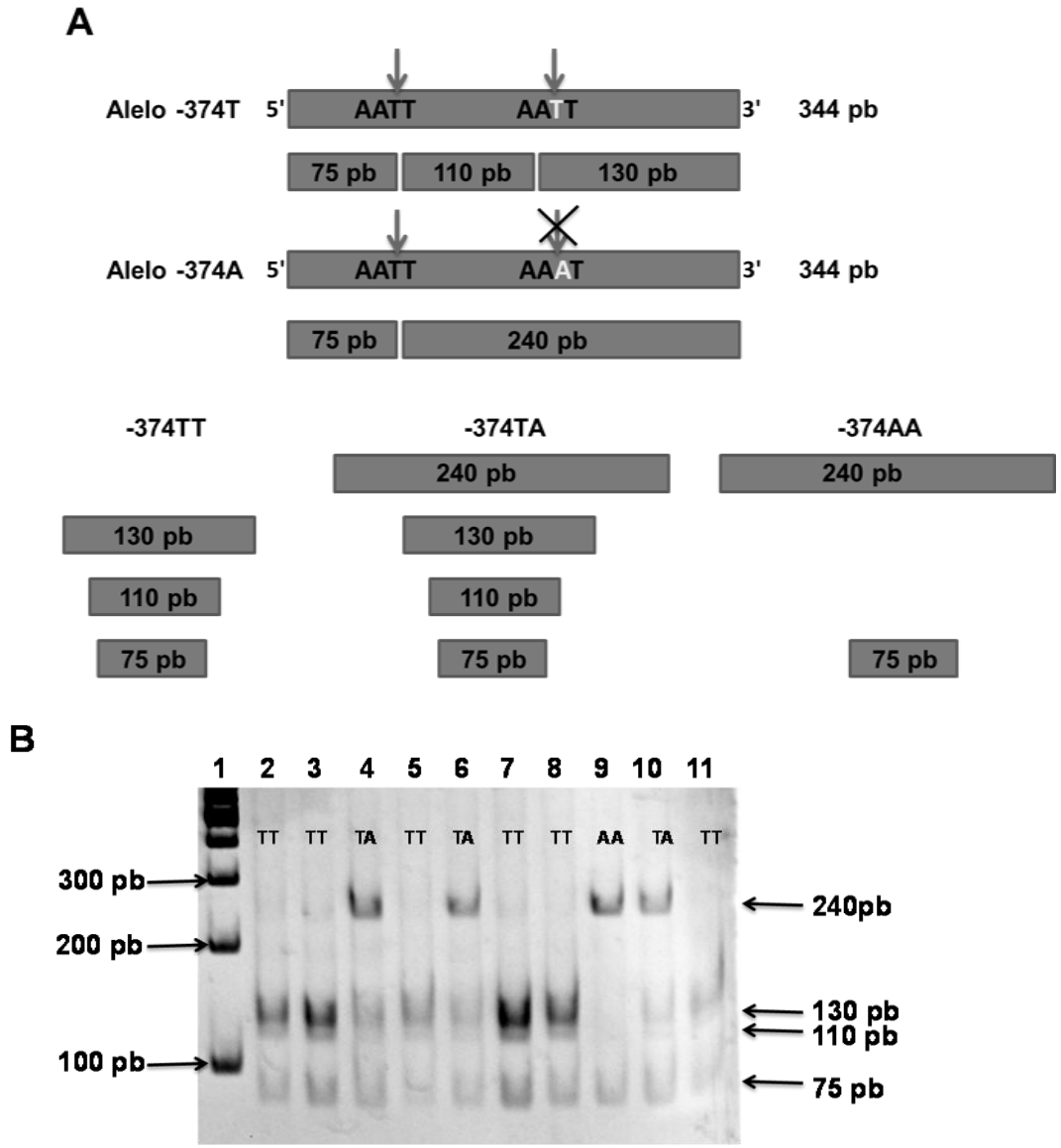


Figura 15. Genotipagem por RFLP do polimorfismo -374T/A.Painel A. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *Tsp509*I. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se na posição -374. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo mutado -374A. Quando o alelto T está presente no fragmento de 344 pb a digestão com a enzima de restrição *Tsp509*Igera os fragmentos 130 pb, 110 pb e 75 pb e quando o alelo A está presente são gerados os fragmentos de 240 pb e 75 pb. Assim, o indivíduo homozigoto TT apresenta o perfil de restrição com 3 fragmentos (130 pb, 110 pb e 75 pb); o heterozigoto TA com 4 fragmentos (240 pb, 130 pb, 110 pb e 75 pb) e o homozigoto AA com dois fragmentos (240 pb e 75 pb). Painel B. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -374T>A da região promotora do gene *RAGE*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). Linha 1: marcador de massa molecular de 100 pb. As linhas 2 ao 11 mostram respectivamente, os perfis de restrição para os genótipos -374TT, -374TT, -374TA, -374TT, -374TA, -374TT, -374TT, -374AA, -374TA e -374TT. À esquerda do gel estão indicados com flechas a massa molecular dos fragmentos de 100 pb, 200 pb e 300 pb do marcador de massa e à direita os fragmentos que podem ser gerados dependendo do genótipo após restrição do produto de PCR com a enzima *Tsp509*I. Fonte: O autor (2015).

Nos painéis A das figuras estão a representação esquemática do perfil de restrição dos fragmentos de 344 pb gerado por reação de PCR após a digestão com enzimas de restrição. Dependendo do alelo presente são gerados diferentes fragmentos que permitem a genotipagem dos polimorfismos em estudo.

A deleção de 63pb foi detectada duplamente. Inicialmente através da eletroforese em gel de agarose do produto de PCR(Figura 13 linha 3), e posteriormente confirmada através da PCR-RFLP para os polimorfismos-374T>A e -429T>C (Figura 14 linha 13).

As frequências genotípicas e alélicas, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos -429T>C, -374T>A e Del 63 pb da região promotora do gene RAGE na amostra em estudo

Polimorfismos		**Controle (n= 105)**	**DM1 (n= 90)**	**P**
-429T>C	T/T	78 (80,4)	75 (84,3)	0,566
(rs1800625)	T/C	19 (19,6)	14 (15,7)	
	C/C	0 (0)	0 (0)	
C	H- W (*P*)	0,285	0,421	
frequência alélica	[95% IC]	0,10 [0,06-0,14]	0,08 [0,04-0,12]	(χ^2) 0,513
-374T>A	T/T	49 (47,1)	46 (51,1)	0,415
(rs1800624)	T/A	35 (33,6)	31 (34,4)	
	A/A	13 (12,6)	12 (13,3)	
	T/D	3 (2,9)	1 (1,1)	
	A/D	4 (3,8)	0	
A	H- W (*P*)	0,1083	0,08	
frequência alélica	[95% IC]	0,31 [0,25-0,38]	0,31 [0,24-0,38]	(χ^2) 0,141
Del 63 pb	I/I	97 (92,4)	89 (98,9)	
(-345-407 bp)	I/D	7 (6,7)	1 (1,1)	0,071
	D/D	1 (0,9)	0 (0)	
D	H- W (*P*)	0,055	0,958	
frequência alélica	[95% IC]	0,043 [0,02-0,07]	0,006 [0-0,02]	**(χ^2) 0,020**

Valores dos genótipos são n (HTTP://EN.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/RAGE_%28RECEPTOR%29). D, deleção e I, inserção
H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2)
95% IC: Intervalo de confiança de 95%
P: teste exato de Fisher bidirecional ou teste de χ^2
Fonte: O autor (2015)

5.4.1.1. Polimorfismo -429T>C da região promotora do gene *RAGE*

As frequências genotípicas do polimorfismo analisado estão de acordo com esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica (P=0,566) ou alélica(P=0,513) entre os grupos estudados (Tabela 5).

A Tabela 6 sumariza as frequências alélicas e genotípicas encontradas para o polimorfismo -429T>C em outros estudos.

Tabela 6. Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -429T>C da região promotora do gene RAGE com dados da literatura.

	Genotipo (%)					Alelo(%)
Grupo étnico	Características	n	TT	TC	CC	C
Euro-	**DM1**	**90**	**75**	**14**	**0**	**8**
Brasileiros	**Saúdaveis**	**105**	**78**	**19**	**0**	**10**
Eslovenos	DM2 + RD	116	73,2	25,9	0,9	13
(GLOBOCNIK	DM2 + RDP	76	81,6	17,1	1,3	9,9
PETROVIC *et al.*,	Saudáveis	70	74,3	25,7	0	14
2003)						
Eslovênios	DM2 + DAC	168	66	31	3	18,5
(KIRBIS *et al.*, 2004)	DM2	241	72,2	26,1	1,7	14,7
Tchecos	DM2 + ND	198	63,1	29,8	7,1	22
(KANKOVA *et al.*,	DM2	179	72,1	25,7	2,2	15
2005)	Saudáveis	228	69,3	26,3	3,9	17
Euro-Brasileiros	DM2	520	77,3	20,6	2,1	12
Afro-Brasileiros	DM2	183	77,0	21,9	1,1	12
(DOS SANTOS *et*						
al., 2005)						
Caucasianos	Infartados	341	72,5	25,7	1,8	15
(ZEE *et al.*, 2006)	Saudáveis	341	67,6	27,4	5,0	19
Asiáticos	DAC	750	75,3	23,2	1,5	13
(YOON *et al.*, 2007)	Saudavéis	805	76,8	21,5	1,7	12
Euro-Brasileiros	DM1	102	64,7	33,3	2,0	19
(PICHETH;	Saudavéis	225	80,4	19,6	0	10
HEIDEMANN*; et al.*,						
2007a)						
Indianos	DM2 + RD	190	69	31	0	15,5
(RAMPRASAD *et al.*,	DM2	189	69	30	1	16,1
2007)	Saudáveis	149	65	35	0	17,4
Euro-Americanos	DM2	481	71,8	26,1	2,1	15
	Saudáveis	496	69.6	28,1	2,3	16
Afro-Americanos	DM2	156	82,7	11,8	5,3	11
(GOULART *et al.*,	Saudáveis	100	75,5	22,4	1,0	12
2008)						
Holandeses	População de Hoorn	721	65,2	29,9	4,9	19,8
(ENGELEN *et al.*,	População de Maastricht	570	65,5	33,8	0,7	17,6
2010)						
Caucasianos	Pacientes em diálise	214	63,6	32,7	3,7	20,1
(KALOUSOVA *et al.*,	Saudáveis	89	68,5	28,1	3,4	17,4
2007; KALOUSOVA						
et al., 2010)						
Caucasianos	Câncer de pâncreas	51	71,7	26,3	2,0	15,1
(KRECHLER *et al.*,	DM2	34	62	31	7,0	22,5
2010)	Saudáveis	154	70,8	25,3	3,9	16,6

Em negrito, dados obtidos neste este estudo: DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; RD: retinopatia diabética; RDP: retinopatia diabética proliferativa; DAC: doença cardíaca coronariana; ND: nefropatia diabética.
Fonte: O autor (2015)

A frequência para o alelo -429C encontrada para o grupo controle (10%) foi menor que a encontrada em Caucasianos (HUDSON *et al.*, 2001b; KANKOVA *et al.*, 2005; ZEE *et al.*, 2006; KALOUSOVA *et al.*, 2007; KANKOVA, BENES e KUCHRICKOVA, 2010; KRECHLER *et al.*, 2010), Indianos (RAMPRASAD *et al.*, 2007) e Euro-Americanos (GOULART *et al.*, 2008); e similiar ao da encontrada em Euro-Brasileiros (PICHETH *et al.*, 2007b), Asiáticos (JIXIONG *et al.*, 2003; YOON *et al.*, 2007) e Afro-Americanos (GOULART *et al.*, 2008). O grupo DM1 apresentou frequência do alelo C (8%) inferior à encontrada em pacientes DM1 Euro-Brasileiros (PICHETH *et al.*, 2007b) como em Caucasianos DM2 (HUDSON *et al.*, 2001b; GLOBOCNIK-PETROVIC *et al.*, 2003; KIRBIS *et al.*, 2004) e Asiáticos DM2 (JIXIONG *et al.*, 2003), sendo similar apenas à uma população Euro-Brasileiros e Afro-Brasileiros em pacientes DM2 (DOS SANTOS *et al.*, 2005).

A associação do polimorfismo -429T>C do gene *RAGE* com diabetes tipo 1 e 2 é controversa. Apenas Hudson e colaboradores (HUDSON *et al.*, 2001b) mostraram que os alelos TC/CC conferiam risco à retinopatia diabética em pacientes DM2, contudo vários outros estudos não foram capazes de replicar esta associação com esta ou outras complicações diabéticas (nefropatia diabética ou DAC) (GLOBOCNIK PETROVIC *et al.*, 2003; JIXIONG *et al.*, 2003; KIRBIS *et al.*, 2004; DOS SANTOS *et al.*, 2005; RAMPRASAD *et al.*, 2007). Com relação ao DM1, existem dois estudos na literatura, um encontrou associação com o DM1 (PICHETH; HEIDEMANN*; et al.*, 2007b) e o outro não encontrou associação nem com DM1 ou complicações diabéticas (PETTERSSON-FERNHOLM; FORSBLOM; HUDSON*; et al.*, 2003).

Picheth e colaboradores (2007a) estudando pacientes diabéticos tipo 1 Euro-Brasileiros encontraram associação entre o polimorfismo -429C com o DM1 e reportaram uma frequência para o alelo menos frequente -429C de 19%, significativamente maior que o observado neste estudo. Embora tenhamos avaliado uma mesma população, mas composta por crianças e adolescentes e não adultos, não fomos capazes de replicar seu achado.

5.4.1.2. Polimorfismo -374T>A da região promotora do gene *RAGE*

A frequência genotípica do polimorfismo analisado está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Os dados não

mostram diferença significativa na distribuição genotípica (P=0,415) ou alélica(P=0,141) entre os grupos estudados (Tabela 5).

Nossos genótipos e frequências alélicas entre controles brancos (KANKOVA *et al.*, 2005; ZEE *et al.*, 2006; PICHETH *et al.*, 2007b; GOULART *et al.*, 2008) e diabéticos tipo 1 (POIRIER *et al.*, 2001; PETTERSSON-FERNHOLM *et al.*, 2003; LINDHOLM *et al.*, 2006; LINDHOLM *et al.*, 2008) foram similares aos previamente reportados em outras populações (Tabela 7).

Tabela 7.Comparações entre as frequências genotípicas ealélicas do polimorfismo -374T>A da região promotora do gene RAGE com dados da literatura.

		Genotipo (%)						Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	TT	TA	AA	TD	AD	A
Euro-Brasileiros	**DM1**	**90**	**46**	**31**	**12**	**1**	**0**	**31**
	Saudáveis	**105**	**49**	**35**	**13**	**3**	**4**	**31**
Britânicos (HUDSON *et al.*, 2001a)	DM2+RD	106	58,5					
	DM2	109	60,6					
	Saudáveis	113	66,5					
Caucasianos (POIRIER *et al.*, 2001)	DM1sem ND	193	48,7	42,2	9,1			30,2
	DM1com ND	199	43,6	44,6	11,8			34,1
Eslovenos (GLOBOCNIK-PETROVIC *et al.*, 2003)	DM2+RD	116	43,1	47,4	9,5			37
	DM2+RDP	76	35,5	52,6	11,8			38,2
	Saudáveis	70	41,4	42,9	15,7			33
Chineses (JIXIONG *et al.*, 2003)	DM2	357						13,7
	Saudáveis	212						12,8
Eslovenos (KIRBIS *et al.*, 2004)	DM2+DAC	168	44,1	48,2	7,7			31,8
	DM2	241	45,6	43,2	11,2			32,8
Europeus (PETTERSSON-FERNHOLM*et al.*, 2003)	DM1+microalbuminúria	166						
	DM1+proteinúriaDM1+nornoalbuminúria	325			12			
	DM1+doença renal	321			15			
		184						
Italianos (FALCONE *et al.*, 2004)	DAC	175			9,7			
	Saudáveis	84			22,6			
Tchecos (KANKOVA *et al.*, 2005)	DM2+ND	198	41,4	46,5	10,6			34
	DM2	179	36,3	50,3	11,7			37
	Saudáveis	228	39,5	49,6	9,6			35
Euro-Brasileiros	DM2	520	46,5	40,7	9,3			31
Afro-Brasileiros (DOS SANTOS *et al.*, 2005)	DM2	183	52,5	31,7	7,1			24
Escandinavos (LINDHOLM *et al.*, 2006)	DM1	867	49,0	43,7	7,3			29
	DM2	2453	55,1	38,4	6,5			26
	Saudáveis	205	62,4	32,7	4,9			21

Caucasianos (ZEE *et al.*, 2006)	Infartados	341	51,6	39,9	8,5	28
	Saudáveis	341	58,1	34,6	7,3	25
	AVC	259	61,6	35,7	2,7	21
	Saudáveis	259	54,5	38,8	6,7	26
Euro-Brasileiros (PICHETH*et al.*, 2007b)	DM1	102	44,1	47,1	8,8	32
	Saudáveis	225	42,7	49,3	8,0	33
Euro-Americanos	DM2	481	56,7	35,1	8,2	26
	Saudáveis	496	55,1	34,9	9,6	27
Afro- Americanos (GOULART *et al.*, 2008)	DM2	156	88,1	9,3	2,6	07
	Saudáveis	100	82,0	13,0	5,0	11
Asiáticos (RAMPRASAD *et al.*, 2007)	DM2+RD	190	72	17	2	8,8
	DM2	189	78	13	1	9,2
	Saudáveis	149	79	13	0	9,3
Caucasianos (LINDHOLM *et al.*, 2008)	DM1	733	47,7	45,7	6,5	29,4
	DM2	2930	55,4	37,8	6,8	25,7
	Saudáveis	205	62	32,7	5,4	21,7
Turcos (KUCUKHUSEYIN *et al.*, 2009)	DM2	52	36,5	46,2	17,3	40,38
	DM2+DAC	54	25,9	35,2	38,9	56,48
	Saudáveis	53	39,6	47,2	13,2	36,79
Caucasianos (KALOUSOVA *et al.*, 2007; KALOUSOVA *et al.*, 2010)	Pacientes em diálise	214	50	40,7	9,3	29,7
	Saudáveis	89	43,8	42,7	13,5	34,8
Caucasianos (BOOR *et al.*, 2010)	Bebes saudáveis	244	13,1	45,5	41,4	35,6
	Mães saudáveis	119	11,8	51,1	37	37,4
Caucasianos (KRECHLER *et al.*, 2010)	Câncer de pâncreas	51	46,5	42,4	11,1	32,3
	DM2	34	36,6	50,7	12,7	38
	Saudáveis	154	44,8	39	16,2	35,7
Italianos (BOIOCCHI *et al.*, 2011)	Infartados	691	40	47	13	37
	Saudáveis	234	33	46	21	44

Em negrito, dados obtidos neste estudo. Abreviações: DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; RD: retinopatia diabética; ND: nefropatia diabética; RDP: retinopatia diabética proliferativa; DAC: doença cardíaca coronariana; AVC: Acidente vascular cerebral.
Fonte: O autor (2015)

Lindholm e colaboradores (2006) encontraram uma associação HLA-DQB1 dependente entre o polimorfismo -374T/A e o DM1. O polimorfismo também foi associado com neuropatia diabética e alterações visuais por retinopatia diabética no grupo DM1. As diferenças de frequência encontradas nos pacientes DM1 e DM2 se deviam as diferenças nos haplótipos HLA, uma vez que foram abolidas após estratificação do genótipo de risco HLA-DQB1. Contudo, o polimorfismo -374T/A não foi associado de forma independente com a positividade de GAD como DQB1*02 (HAGOPIAN *et al.*, 1995).

Estes resultados indicam que o polimorfismo -374T/A é dependente do genótipo HLA-DQB1 e sua frequência pode variar em diferentes populações (HERMANN *et al.*, 2004), e o mesmo ocorre com a frequência do polimorfismo -374T/A. E como Lindholm e colaboradores (2006) só encontraram associação significativa entre o polimorfismo -374T/A e retinopatia e nefropatia diabética em pacientes com DM1 com o genótipo de risco HLA-DQB1, uma possível explicação para as diferenças observadas entre nosso estudo e os realizados por Lindholm e colaboradores (2006) poderia ser o pequeno grau de positividade dos anticorpos encontrados (Tabela 1) em adição ao pequeno número amostral e diferenças étnicas.

Outro fator que poderia sugerir que a baixa positividade dos anticorpos devido ao menor presença dos alelos de risco dos haplótipos DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 e DRB1*0401-DQA1*0301-DQB1*0302 em nossa amostra foi o fato de que a frequência genotípica do polimorfismo analisado está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, diferentemente do encontrado por Lindholm e colaboradores (2008). Estes autores justificam que o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg estaria de acordo com a observação de que o sinergismo dos haplótipos DR3 e DR4 que estão fortemente associados a característica autoimune do DM1 levaria ao excesso de pacientes heterozigotos em relação aos homozigotos (NOBLE *et al.*, 1996).

Devemos ressaltar que Picheth e colaboradores (2007b) também não encontraram associação entre o polimorfismo -374T/A e DM1 numa população de Euro-brasileiros e a existência de uma controvérsia no papel do polimorfismo -374 T>A na patologia das complicações diabéticas. Estudos com esse polimorfismo encontraram tanto associações positivas com a diminuição do risco de complicações diabéticas (PETTERSSON-FERNHOLM; FORSBLOM; PEROLA*; et al.*, 2003) como com o aumento de risco (LINDHOLM *et al.*, 2006; LINDHOLM *et al.*, 2008) ou mesmo ausência de associação (POIRIER *et al.*, 2001) em pacientes com DM1.

O mesmo foi levantado por Engelen e colaboradores (2010) e os autores acreditam que estes resultados contraditórios poderiam ser devido ao número amostral e diferenças no *status* do metabolismo da glicose. Os autores sugerem que a explicação para este fato poderia ser o fator de ligação nuclear, cuja ligação poderia ser impedida pela substituição de T por A na posição -374, o que

influenciaria a repressão da transcrição de *RAGE* (LI e SCHMIDT, 1997; HUDSON *et al.*, 2001a) que é glicose dependente.

5.4.1.3. Deleção de 63 pb da região promotora do gene RAGE

A frequência genotípica da deleção analisada está de acordo com o esperadopelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica (P=0,071), somente na frequência alélica (P=0,020) entre os grupos estudados (Tabela 5).

A frequência do alelo menos frequente para a deleção de 63pb no grupo controle foi maior àquela descrita para a população de Alemães (4,3 % *vs*0,7%) (RUDOFSKY *et al.*, 2004) e Britânicos (4,3 % *vs*0%) (HUDSON *et al.*, 2001a) saudáveis, mas os pacientes com DM1 apresentaram frequência similar à população Alemã (0,6 %*vs*1,0%), (RUDOFSKY *et al.*, 2004) e Suéca (1,6% em Escandinavos e 0,6% não Escandinavos), (LINDHOLM *et al.*, 2006). A frequência da deleção no grupo DM1 também foi similar ao de pacientes DM2 Caucasianos (RUDOFSKY *et al.*, 2004; LINDHOLM *et al.*, 2006) e Euro-Brasileiros (DOS SANTOS *et al.*, 2005), mas inferior à Afro-Brasileiros (DOS SANTOS *et al.*, 2005) e Suécos não Escandinavos (LINDHOLM *et al.*, 2006) (Tabela 8).

No estudo realizado por Rudofsky e colaboradores (2004), foi observada correlação entre a deleção de 63 pb da região promotora do gene RAGEcom a diminuição dos risco de nefropatia em pacientes DM2. Também foi mostrado, que a deleção de 63 pb provavelmente confere um benefício marginal na sobrevida livre de eventos cardiovasculares em pacientes DM2 com nefropatia (POON *et al.*, 2010). Contudo, a baixa frequência de um dos alelos neste estudo não permitiu análises com maior poderdiscriminatório devido ao tamanho amostral utilizado.

Existe uma controvérsia no papel dos polimorfismos -429 T>C, -374 T>A e a deleção de 63 bp I/D na patogênese das complicações do DM. Em estudos com esses polimorfismos foram encontradas associações positivas com a diminuição do risco de complicações diabéticas (PETTERSSON-FERNHOLM; FORSBLOM; HUDSON*; et al.*, 2003; RUDOFSKY *et al.*, 2004). Em estudo realizado por (HUDSON *et al.*, 2001b) foi encontrada uma associação entre o aumento da

retinopatia diabética relacionadas com os genótipos TC ou CC (-429T>C) e aumento da expressão do gene RAGE resultado dos alelo 429C, 374 A e deleção de 63 pb .

Tabela 8.Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas da deleção de 63 pb da região promotora do gene RAGE com dados da literatura.

		Genotipo %				Alelo %
Grupo étnico	**Características**	**n**	**II**	**ID**	**DD**	**D**
Euro-Brasileiros	**DM1**	**90**	**89**	**1**	**0**	**0,6**
	Saudáveis	**105**	**97**	**7**	**1**	**4,3**
Brancos (Alemães)	DM1	559	97,8	2,2	0	1
(RUDOFSKY *et al.*, 2004)	DM2	528	97,7	2,3	0	1
	Saudáveis	475	98,5	1,5	0	0,7
Euro-Brasileiros	DM2	520	96,5	3,5	0	2
Afro-Brasileiros	DM2	183	91,3	8,7	0	4
(DOS SANTOS *et al.*, 2005)						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM1: *Diabetes mellitus* tipo1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2.
Fonte: O autor (2015)

Estes achados contraditórios nas associações dos polimorfismos de RAGE podem ser devidos às diferenças do tamanho amostral, etnicidade da população estudada e *status* do metabolismo de glicose dos indivíduos. Considerando o fato de que o *Diabetes mellitus* é uma doença multifatorial, *backgroung* genético diferente ou padrões de desiquilíbrio de ligação podem contribuir para a divergência, e um polimorfismo pode estar em estrita ligação com outro próximo à uma variante causal em uma etnia e não em outra (YU *et al.*, 2010; NIU *et al.*, 2012). O efeito modificador do *status* do metabolismo de glicose é suportado pelos achados de Engelen e colaboradores (2010) com uma grande população (n=1291) de Caucasianos. Estes autores mostraram que as associações entre os polimorfismos do gene RAGE diferia entre os diferentes *status* do metabolismo da glicose.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *Diabetes mellitus* tipo 1 é uma patologia que afeta em sua maioria a população jovem Brasileira, sendo caracterizada como uma doença auto-imune com a presença de anticorpos circulantes contra celulas beta.

Neste projeto avaliamos o comportamento de marcadores tradicionais e propôs um novo biomarcador para controle glicêmico, o 1,5 anidroglucitol para o diabetes, e suas associações com marcadores moleculares, caracterizados por polimorfismos de gene que têm envolvimento com o diabetes ou fatores de risco para seu desenvolvimento. Também se buscou encontrar valores de referência para indivíduos saudáveisdesse novo biomarcador 1,5 AG.

Reconhecidamente poucos estudos relatam valores de referência para o 1,5 AG em crianças e adolescentes. Assim como poucos trabalhos relatam os polimorfismos estudados e sua associação com o diabetes tipo 1. É neste contexto que se situa o presente trabalho, ontribuir para o conhecimento de novos marcadores para identificar fatores de risco ou proteção associados ao *diabetes mellitus* tipo 1.

Polimorfismos funcionais ou aqueles que alteram a composição de aminoácidos (*missense*) do gene RAGE tem sido implicados no aumento de risco para complicações diabéticas, incluindo microalbuminúria, nefropatia, retinopatia e doença cardiovascular, através da interação entre AGE-RAGE (NEWFIELD *et al.*, 1997; KALOUSOVA *et al.*, 2005; D'AGATI *et al.*, 2010; MAHAJAN; DHAWAN, 2013). Contudo, o mecanismo de ação associado a estas variabilidades genéticas permanece obscuro no presente.

7.0 CONCLUSÕES

- Concentrações séricas de 1,5 Anidroglucitol menores que 8,1 µg/mL permitiram discriminar crianças e adolescentes com diabetes tipo 1 de crianças e adolescentes saudáveis, com sensibilidade e especificidade próximas a 90%
- A concentração de 1,5 anidroglucitol varia com a idade. O incremento na idade foi associado a redução da concentração de 1,5AG.
- A concentração de 1,5AG está associada ao gênero na mesma faixa etária. Meninos tanto adolescentes, como crianças apresentam concentrações de 1,5AG significativamente maiores em relação às meninas.
- Os polimorfismos funcionais da região promotora do gene RAGE-429T>C (rs1800625);-374T>A(rs1800624) e 63 Del pb (-345-407 bp) não foram associados ao *diabetes mellitus* tipo 1 em crianças e adolescentes na população em estudo.
- A frequência do alelo raro para o polimorfismo -426T>C (rs1800625) observada em indivíduos saudáveis, 10% (6-14%, 95%IC) é semelhante à observada na maioria Causasóide e em Euro e Afro-Brasileiros descritos na literatura.
- A frequência do alelo raro para o polimorfismo -374T>A (rs1800624) observada em indivíduos saudáveis, 31% (25-38%, 95%IC) é semelhante à descrita para Causasóides e Afro-Brasileiros e significativamente maior do que aquela descrita para Chineses (12,8%).
- A frequência da deleção de 63 pares de base (63Del; -345-407 bp) observada em indivíduos saudáveis é similar àquela descritas para outras populações. A baixa frequência desta variação na população e o tamanho amostral do estudo não permitem inferências de associação desta variabilidade genética no presente estudo.

REFERÊNCIAS

ACTION TO CONTROL CARDIOVASCULAR RISK IN DIABETES STUDY, G. *et al.* Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. **N Engl J Med,** v. 358, n. 24, p. 2545-59, 2008.

AKCILAR, R. *et al.*The effects of apelin treatment on a rat model of type 2 diabetes. **Adv Med Sci**. v. 60, n.1, p. 94-100. 2014.

AMERICAN DIABETES, A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care,** v. 37 Suppl 1, n. p. S81-90, 2014.

ADA. Standards of Medical Care in Diabetes—2015. **Diabetes Care,** v. 38, n. 1, p. 2015.

AHLUWALIA, N. *et al.* Trends in overweight prevalence among 11-, 13- and 15-year-olds in 25 countries in Europe, Canada and USA from 2002 to 2010. **Eur J Public Health,** 1, Bobigny, France.

AKANUMA, Y. *et al.* Urinary excretion of 1,5-anhydro-D-glucitol accompanying glucose excretion in diabetic patients. **Diabetologia,** Institute for Diabetes Care and Research, Asahi Life Foundation, Tokyo, Japan., v. 31, n. 11, p. 831-5, 1988.

AL-SWAILEM, S. *et al.* Induction of endothelial RAGE expression in pterygium. **Mol Vis**., v. 20, n. p. 1740-8, 2014.

AMED, S. *et al.* Adherence to clinical practice guidelines in the management of children, youth, and young adults with type 1 diabetes--a prospective population cohort study. **J Pediatr,** Vancouver, v. 163, n. 2, p. 543-8, 2013.

ANAYA, J. M. *et al.* Familial clustering of autoimmune diseases in patients with type 1 diabetes mellitus. **J Autoimmun**, v. 26, n. 3, p. 208-14, 2006.

ARAUJO, J. *et al.* Prevalence of autoimmune thyroid disease and thyroid dysfunction in young Brazilian patients with type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes,** , Recife, Pernambuco, Brazil, v. 9, n. 4 Pt 1, p. 272-6, 2008.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160-71, 2012.

ASLEH, R. *et al.* Haptoglobin genotype is a regulator of reverse cholesterol transport in diabetes in vitro and in vivo. **Circ Res**., v. 99, n. 12, p. 1419-25, 2006.

ASSOCIATION AMERICAN DIABETES. Standards of Medical Care in Diabetes—2014. v. n. p. 2014.

ATKINSON.M.A; EISENBARTH.G.S; A.W, M. Type 1 Diabetes. **Lancet,** v. 383, n. p. 69-82, 2014.

BACH, J. F.; CHATENOUD, L. The hygiene hypothesis: an explanation for the increased frequency of insulin-dependent diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 2, p. a007799, 2012.

BALDA, C. A. ; PACHECO-SILVA A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**v. 45 n. 2 São Paulo, abr./jun. 1999.

BAPTISTA ML *et al.* Prevalence of celiac disease in Brazilian children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**. v. 41, n.5, p. 621-4. 2005.

BARKER, J. M. *et al.* Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 8, p. 3896-902, 2004.

BASTA, G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. **Atherosclerosis,** v. 196, n. 1, p. 9-21, 2008.

BERHAN, Y. *et al.* Thirty years of prospective nationwide incidence of childhood type 1 diabetes: the accelerating increase by time tends to level off in Sweden. **Diabetes**., v. 60, n. 2, p. 577-81, 2011.

BIERHAUS, A. *et al.* Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. **Circulation**., v. 96, n. 7, p. 2262-71, 1997.

BLANTON, D. *et al.* Reduced serum vitamin D-binding protein levels are associated with type 1 diabetes. **Diabetes**, USA., v. 60, n. 10, p. 2566-70, 2011.

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1293-300, 2010.

BOERNER, B. P.; SARVETNICK, N. E. Type 1 diabetes: role of intestinal microbiome in humans and mice. **Ann N Y Acad Sci**, USA., v. 1243, n. p. 103-18, 2011.

BOIOCCHI, C. *et al.* Age of onset of myocardial infarction: is promoter polymorphism of the RAGE gene implicated? **Rejuvenation Res**, v. 14, n. 1, p. 67-73, 2011.

BOOR, P. *et al.* Association of biochemical parameters and RAGE gene polymorphisms in healthy infants and their mothers. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 15-16, p. 1034-40, 2010.

BORITZA, K. C. **1,5 Anidroglucitol e Controle Glicêmico em Pacientes com Diabetes mellitus tipo 1, tipo 2 e Gestacional**. 140 p. (Mestre) - Análises Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

BORITZA, K. C. *et al.* 1,5 Anhydroglucitol serum concentration as a biomarker for screening gestational diabetes in early pregnancy. **Clin Chem Lab Med,** v. 52, n. 8, p. e179-81, 2014.

BRASIL, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil.**Disponível em: Acesso em: 12 abr.

BRETT, J. *et al.* Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. **Am J Pathol**., v. 143, n. 6, p. 1699-712, 1993.

BROWNLEE, M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. **Annu Rev Med,** Diabetes., v. 46, n. p. 223-34, 1995.

BROWNLEE, M.; CERAMI, A.; VLASSARA, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. **N Engl J Med**., v. 318, n. 20, p. 1315-21, 1988.

BUCCIARELLI, L. G. *et al.* RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. **Cell Mol Life Sci**., v. 59, n. 7, p. 1117-28, 2002.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H.; KJOS, S. L.; WATANABE, R. M. What is gestational diabetes? **Diabetes Care**, v. 30, n. Suppl 2, p. p. S105-111, 2007.

BUSE, J. B. *et al.* Serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark): a short-term glycemic marker. **Diabetes Technol Ther**, v. 5, n. 3, p. 355-63, 2003.

BUTTERFIELD, W. J.; KEEN, H.; WHICHELOW, M. J. Renal glucose threshold variations with age. **Br Med J,** v. 4, n. 5578, p. 505-7, 1967.

CAMPBELL, M. S. *et al.* A contrast between children and adolescents with excellent and poor control: the T1D Exchange clinic registry experience. **Pediatr Diabetes**, v. 15, n. 2, p. 110-7, 2014.

CANADIAN-DIABETES-ASSOCIATION-CLINICAL-PRACTICE-GUIDELINES-EXPERT-COMMITTEE. Canadian Diabetes Association 2013 Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada. **Can J Diabetes,** v. 37, n. Suppl 1, p. 212, 2013.

CANIVELL, S.; GOMIS, R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. **Autoimmun Rev,**, v. 13, n. 4-5, p. 403-7, 2014.

CENTERS FOR DISEASE, C.; PREVENTION. Daily dietary fat and total food-energy intakes--Third National Health and Nutrition Examination Survey, Phase 1, 1988-91. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep,** v. 43, n. 7, p. 116-7, 123-5, 1994.

CESARINI, P. R. *et al.* Prevalence of immunological markers (Anti-GAD and Anti-IA2) in first-degree relatives of patients with type 1 diabetes in Great São Paulo City. **Rev. Assoc. Med. Bras.,** v. 49, n. 4, p. 395-400, 2003.

CHILLARON, J. J. *et al.* Type 1 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular risk. **Metabolism**, v. 63, n. 2, p. 181-7, 2014.

CHILLARON, J. J.; GODAY, A.; PEDRO-BOTET, J. [Metabolic syndrome, type 1 diabetes mellitus and insulin resistance]. **Med Clin (Barc),** Servicio de Endocrinologia, Hospital del Mar, Barcelona, Espana., v. 130, n. 12, p. 466-70, 2008.

CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. **Lancet,** v. 376, n. 9753, p. 1670-81, 2010.

CHRISTAKIS, D. A. *et al.* Continuity and quality of care for children with diabetes who are covered by medicaid. **Ambul Pediatr**, v. 1, n. 2, p. 99-103, 2001.

COHEN, R. M. A1C: does one size fit all? **Diabetes Care,** v. 30, n. 10, p. 2756-8, 2007.

COLAGIURI, S. *et al.* Glycemic thresholds for diabetes-specific retinopathy: implications for diagnostic criteria for diabetes. **Diabetes Care,** v. 34, n. 1, p. 145-50, 2011.

COLLIN P *et al.* Endocrinological disorders and celiac disease. **Endocr Rev**. v. 23, n.4, p. 4464-83 2002.

CONCANNON, P.; RICH, S. S.; NEPOM, G. T. Genetics of type 1A diabetes. **N Engl J Med,** v. 360, n. 16, p. 1646-54, 2009.

CONN, V. S. *et al.* Meta-analysis of health behavior change interventions in type 1 diabetes. **Am J Health Behav**, v. 32, n. 3, p. 315-29, 2008.

COOPER, J. D. *et al.* Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 5, p. 1624-31, 2011.

COSTACOU, T.; EVANS, R. W.; ORCHARD, T. J. High-density lipoprotein cholesterol in diabetes: is higher always better? **J Clin Lipidol**, v. 5, n. 5, p. 387-94, 2011.

CUCCA, F. *et al.* A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 19, p. 2025-37, 2001.

CUDWORTH, A. G.; WOODROW, J. C. HL-A system and diabetes mellitus. **Diabetes,** v. 24, n. 4, p. 345-9, 1975.

D'AGATI, V. *et al.* RAGE, glomerulosclerosis and proteinuria: roles in podocytes and endothelial cells. **Trends Endocrinol Metab,** v. 21, n. 1, p. 50-6, 2010.

DABELEA, D. The accelerating epidemic of childhood diabetes. **Lancet,** v. 373, n. 9680, p. 1999-2000, 2009.

DABELEA, D. *et al.*Incidence of diabetes in youth in the United States. **JAMA,** v. 297, n. 24, p. 2716-24, 2007.

DAHLQUIST, G. *et al.* The Swedish childhood diabetes study--results from a nine year case register and a one year case-referent study indicating that type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus is associated with both type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and autoimmune disorders. **Diabetologia**., v. 32, n. 1, p. 2-6, 1989.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847-58, 2006.

DAVIDSON, M. B. The effect of aging on carbohydrate metabolism: a review of the English literature and a practical approach to the diagnosis of diabetes mellitus in the elderly. **Metabolism,** v. 28, n. 6, p. 688-705, 1979.

DAVIDSON, M. B.; SCHRIGER, D. L. Effect of age and race/ethnicity on HbA1c levels in people without known diabetes mellitus: implications for the diagnosis of diabetes. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 87, n. 3, p. 415-21, 2010.

DE FERRANTI, S. D. *et al.*Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. **Diabetes Care,** v. 37, n. 10, p. 2843-63, 2014.

DEVENDRA, D.; LIU, E.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: recent developments. **BMJ,** v. 328, n. 7442, p. 750-4, 2004.

DIABETES, D. A. C. O. D. M.; 1:S55-S60., C. S. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 31, p. 55-60. 2008.

DONATO, R. RAGE: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins. **Curr Mol Med,** v. 7, n. 8, p. 711-24, 2007.

DOS SANTOS, K. G. *et al.*The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes. **Mol Genet Metab,** v. 85, n. 2, p. 149-56, 2005.

DUNGAN, K. M. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. **Expert Rev Mol Diagn,** v. 8, n. 1, p. 9-19, 2008.

DUNGAN, K. M. *et al.* Potential for use of 1,5-anhydroglucitol when initiating insulin therapy in people with type 2 diabetes and suboptimal control with oral antidiabetic drugs. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 96, n. 3, p. e66-9, 2012.

DUNGAN, K. M. *et al.* 1,5-anhydroglucitol and postprandial hyperglycemia as measured by continuous glucose monitoring system in moderately controlled patients with diabetes. **Diabetes Care,** v. 29, n. 6, p. 1214-9, 2006.

DWORACKA, M.; WINIARSKA, H. The application of plasma 1,5-anhydro-D-glucitol for monitoring type 2 diabetic patients. **Dis Markers,** v. 21, n. 3, p. 127-32, 2005.

DWORACKA, M. *et al.* 1,5-anhydro-D-glucitol: a novel marker of glucose excursions. **Int J Clin Pract Suppl,** v. n. 129, p. 40-4, 2002.

EATON, D. K. *et al.* Comparison of paper-and-pencil versus Web administration of the Youth Risk Behavior Survey (YRBS): risk behavior prevalence estimates. **Eval Rev,** v. 34, n. 2, p. 137-53, 2010.

EHEHALT, S. *et al.* Prediction model for the incidence and prevalence of type 1 diabetes in childhood and adolescence: evidence for a cohort-dependent increase within the next two decades in Germany. **Pediatr Diabetes,** v. 13, n. 1, p. 15-20, 2012.

EISENBARTH.G.S. Update in type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 92, p. 2403-7. 2007.

EISENBARTH GS., E. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmunedisease. **N Engl J Med**. v. 314, p. 1360-8. 1986.

EISENBARTH, G. S. Banting Lecture 2009: An unfinished journey: molecular pathogenesis to prevention of type 1A diabetes. **Diabetes,** v. 59, n. 4, p. 759-74, 2010.

EMERGING RISK FACTORS, C. *et al.* Glycated hemoglobin measurement and prediction of cardiovascular disease. **JAMA**, United Kingdom.

EMOTO, M. *et al.* Plasma 1,5-anhydroglucitol concentration in patients with end-stage renal disease with and without diabetes mellitus. **Nephron,** v. 61, n. 2, p. 181-6, 1992.

ENGELEN, L. *et al.* The association between the -374T/A polymorphism of the receptor for advanced glycation endproducts gene and blood pressure and arterial stiffness is modified by glucose metabolism status: the Hoorn and CoDAM studies. **J Hypertens,** v. 28, n. 2, p. 285-93, 2010.

ENGELGAU, M. M. *et al.*Comparison of fasting and 2-hour glucose and HbA1c levels for diagnosing diabetes. Diagnostic criteria and performance revisited. **Diabetes Care,** Division of Diabetes Translation, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30341-3724, USA. mxe1@ccdddt1.cm.cdc.gov, v. 20, n. 5, p. 785-91, 1997.

ERDBERG, A. *et al.* Urine uric acid excretion in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Nephron**, v. 60, n. 2, p. 134-7, 1992.

ERLICH, H. *et al.* HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 1084-92, 2008.

ERLICH, H. A. *et al.* HLA class II alleles and susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus in Mexican-American families. **Nat Genet**., v. 3, n. 4, p. 358-64, 1993.

ESPARZA MARTIN, N.; GARCIA NIETO, V. Hypouricemia and tubular transport of uric acid. **Nefrologia,** v. 31, n. 1, p. 44-50, 2011.

ESPOSITO, C. *et al.* Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. **J Exp Med**, v. 170, n. 4, p. 1387-407, 1989.

EVANGELOU, M. *et al.* A method for gene-based pathway analysis using genomewide association study summary statistics reveals nine new type 1 diabetes associations. **Genet Epidemiol,** v. 38, n. 8, p. 661-70, 2014.

FALCONE, C. *et al.* -374T/A polymorphism of the RAGE gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis. **Clin Chim Acta,** v. 354, n. 1-2, p. 111-6, 2005.

FALCONE, C. *et al.* Relationship between the -374T/A RAGE gene polymorphism and angiographic coronary artery disease. **Int J Mol Med,** v. 14, n. 6, p. 1061-4, 2004.

FALCONE, C. *et al.* The -374T/A variant of the rage gene promoter is associated with clinical restenosis after coronary stent placement. **Int J Immunopathol Pharmacol,** v. 20, n. 4, p. 771-7, 2007.

FALCONE, C. *et al.* The -374T/A RAGE polymorphism protects against future cardiac events in nondiabetic patients with coronary artery disease. **Arch Med Res**., v. 39, n. 3, p. 320-5, 2008.

FORBES, J. M. *et al.* Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) provides a link between genetic susceptibility and environmental factors in type 1 diabetes. **Diabetologia,** v. 54, n. 5, p. 1032-42, 2011.

FOROUHI.N.G; WAREHAM.N.J. Epidemiology of diabetes. **DIABETES :BASIC FACTS,** v. 42, n. p. 2014.

FOWLER, M. J. Diabetes: Magnitude and Mechanisms. v. n. p. 2007.

FRANZESE, A.; VALERIO, G.; SPAGNUOLO, M. I. Management of diabetes in childhood: are children small adults? **Clin Nutr**, v. 23, n. 3, p. 293-305, 2004.

FRATTALI, A. L.; WOLF, B. A. 1,5-Anhydroglucitol: a novel serum marker for screening and monitoring diabetes mellitus? **Clin Chem,** v. 40, n. 11 Pt 1, p. 1991-3, 1994.

FREDERIKSEN, B. N. *et al.* Evidence of stage- and age-related heterogeneity of non-HLA SNPs and risk of islet autoimmunity and type 1 diabetes: the diabetes autoimmunity study in the young. **Clin Dev Immunol,** v. 2013, n. p. 417657, 2013.

FUNASAKO, M. *et al.* Effect of ageing on erythrocyte aldose reductase and sorbitol dehydrogenase activity. **Mech Ageing Dev,** v. 73, n. 2, p. 137-43, 1994.

FUNASAKO, M. *et al.* Effect of aging on plasma 1,5-anhydroglucitol levels in humans and rats. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 25, n. 1, p. 35-41, 1994.

GALE, E. A. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. **Diabetes,** v. 51, n. 12, p. 3353-61, 2002.

GALE, E. A. Type 1 diabetes in the young: the harvest of sorrow goes on. **Diabetologia,** v. 48, n. 8, p. 1435-8, 2005.

GALLAGHER, E. J.; LE ROITH, D.; BLOOMGARDEN, Z. Review of hemoglobin A(1c) in the management of diabetes. **J Diabetes,**, v. 1, n. 1, p. 9-17, 2009.

GAN, M. J.; ALBANESE-O'NEILL, A.; HALLER, M. J. Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care,** v. 42, n. 10, p. 269-91, 2012.

GIANANI, R. *et al.* Dimorphic histopathology of long-standing childhood-onset diabetes. **Diabetologia,** v. 53, n. 4, p. 690-8, 2010.

GILLESPIE, K. M. *et al.* The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. **Lancet,** v. 364, n. 9446, p. 1699-700, 2004.

GLOBOCNIK PETROVIC, M. *et al.* The - 429 T/C and - 374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene are not risk factors for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes. **Klin Monbl Augenheilkd,** , v. 220, n. 12, p. 873-6, 2003.

GOLDIN, A. *et al.* Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation,** v. 114, n. 6, p. 597-605, 2006.

GOLEMBIEWSKA, E. *et al.* Renal handling of uric acid in patients with type 1 diabetes in relation to glycemic control. **Arch Med Res**, Poland., v. 36, n. 1, p. 32-5, 2005.

GOLIK, A. *et al.* Renal uric acid handling in non-insulin-dependent diabetic patients with elevated glomerular filtration rates. **Clin Sci (Lond),** v. 85, n. 6, p. 713-6, 1993.

GONZALEZ, I. *et al.* The immunobiology of the receptor of advanced glycation end-products: trends and challenges. **Immunobiology,** v. 218, n. 5, p. 790-7, 2013.

GOTO, M. *et al.* Correlation between baseline serum 1,5-anhydroglucitol levels and 2-hour post-challenge glucose levels during oral glucose tolerance tests. **Endocr J,** v. 58, n. 1, p. 13-7, 2011.

GOULART, A. C. *et al.* Polymorphisms in advanced glycosylation end product-specific receptor (AGER) gene, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. **Clin Chim Acta,** v. 398, n. 1-2, p. 95-8, 2008.

GRAY, W. N.; DOLAN, L. M.; HOOD, K. K. Impact of blood glucose monitoring affect on family conflict and glycemic control in adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 99, n. 2, p. 130-5, 2013.

GROSS, J. L. *et al.* Diabetes Mellitus: Diagnosis, Classification and Glucose Control Evaluation. **Arq Bras Endocrinol Metab,** v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

ADVANCED COLABORATIVE GROUP. *et al.* Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. **N Engl J Med,** v. 358, n. 24, p. 2560-72, 2008.

DIAMOND PROJECT GROUP. Incidence a nd trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. **Diabet Med,** v. 23, n. 8, p. 857-66, 2006.

GUEDES, D. P. *et al.* Low body weight/thinness, overweight and obesity of children and adolescents from a Brazilian region of low economic status. **Rev Paul Pediatr,** v. 31, n. 4, p. 437-43, 2013.

GUY, J. *et al.*Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. **Diabetes Care,** v. 32, n. 3, p. 416-20, 2009.

HAGOPIAN, W. A. *et al.* Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. **J Clin Invest,** v. 95, n. 4, p. 1505-11, 1995.

HALLER, M. J. *et al.* Radial artery tonometry demonstrates arterial stiffness in children with type 1 diabetes. **Diabetes Care,** v. 27, n. 12, p. 2911-7, 2004.

HANAFUSA, T.; IMAGAWA, A. Fulminant type 1 diabetes: a novel clinical entity requiring special attention by all medical practitioners. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab,** v. 3, n. 1, p. 36-45; quiz 2p following 69, 2007.

HARJUTSALO, V.; SJOBERG, L.; TUOMILEHTO, J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. **Lancet,** v. 371, n. 9626, p. 1777-82, 2008.

HATTERSLEY, A. *et al.* The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. **Pediatr Diabetes**, v. 10 Suppl 12, n. p. 33-42, 2009.

HERMAN, W. H. *et al.* Differences in A1C by race and ethnicity among patients with impaired glucose tolerance in the Diabetes Prevention Program. **Diabetes Care,** v. 30, n. 10, p. 2453-7, 2007.

HERMANN, R. *et al.* Genetic screening for individuals at high risk for type 1 diabetes in the general population using HLA Class II alleles as disease markers. A

comparison between three European populations with variable rates of disease incidence. **Diabetes Metab Res Rev,** v. 20, n. 4, p. 322-9, 2004.

HEROLD, K. C. *et al.* Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. **Nat Rev Immunol,** v. 13, n. 4, p. 243-56, 2013.

HOFMANN, M. A. *et al.* RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. **Cell,** v. 97, n. 7, p. 889-901, 1999.

HOLMES, G. K. Screening for coeliac disease in type 1 diabetes. **Arch Dis Child,** v. 87, n. 6, p. 495-8, 2002.

HORTENHUBER, T. *et al.* Endothelial progenitor cells are related to glycemic control in children with type 1 diabetes over time. **Diabetes Care,** v. 36, n. 6, p. 1647-53, 2013.

HOWSON, J. M. *et al.* Genetic analysis of adult-onset autoimmune diabetes. **Diabetes,** v. 60, n. 10, p. 2645-53, 2011.

HUDSON, B. I. *et al.* Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders. **Arch Biochem Biophys,** v. 419, n. 1, p. 80-8, 2003.

HUDSON, B. I. *et al.* Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants. **FASEB J,** v. 22, n. 5, p. 1572-80, 2008.

HUDSON, B. I. *et al.* Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. **Diabetes,** v. 50, n. 6, p. 1505-11, 2001a.

HUDSON, B. I. *et al.* Study of the -429 T/C and -374 T/A receptor for advanced glycation end products promoter polymorphisms in diabetic and nondiabetic subjects with macrovascular disease. **Diabetes Care,** v. 24, n. 11, p. 2004, 2001b.

HUTTUNEN, H. J.; FAGES, C.; RAUVALA, H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. **J Biol Chem,** v. 274, n. 28, p. 19919-24, 1999.

HYTTINEN, V. *et al.* Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p. 1052-5, 2003.

IMAGAWA, A.; HANAFUSA, T. Fulminant type 1 diabetes--an important subtype in East Asia. **Diabetes Metab Res Rev,** v. 27, n. 8, p. 959-64, 2011.

INTERNATIONAL EXPERT, C. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care,** v. 32, n. 7, p. 1327-34, 2009.

ITO, C. *et al.*Importance of OGTT for diagnosing diabetes mellitus based on prevalence and incidence of retinopathy. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 49, n. 2-3, p. 181-6, 2000.

JAHROMI, M. M.; EISENBARTH, G. S. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. **Cell Mol Life Sci,** , v. 64, n. 7-8, p. 865-72, 2007.

JANUSZEWSKI, A. S. *et al.* Plasma 1,5 anhydroglucitol levels, a measure of short-term glycaemia: assay assessment and lower levels in diabetic vs. non-diabetic subjects. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 95, n. 1, p. e17-9, 2012.

JIXIONG, X. *et al.* -429T/C and -374T/A polymorphisms of RAGE gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care,** v. 26, n. 9, p. 2696-7, 2003.

JUNG, E. S. *et al.* Thyroid autoimmunity in children and adolescents with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **Ann Pediatr Endocrinol Metab,** v. 19, n. 2, p. 76-9, 2014.

KAHN, H. S. *et al.* Association of type 1 diabetes with month of birth among U.S. youth: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Diabetes Care,** v. 32, n. 11, p. 2010-5, 2009.

KALOUSOVA, M. *et al.* Genetic predisposition to advanced glycation end products toxicity is related to prognosis of chronic hemodialysis patients. **Kidney Blood Press Res**, v. 33, n. 1, p. 30-6, 2010.

KALOUSOVA, M. *et al.* Receptor for advanced glycation end products--soluble form and gene polymorphisms in chronic haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant,** v. 22, n. 7, p. 2020-6, 2007.

KALOUSOVA, M. *et al.* Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. **Mutat Res,** v. 579, n. 1-2, p. 37-46, 2005.

KAMETANI, S. *et al.* Reduced renal reabsorption of 1,5-anhydro-D-glucitol in diabetic rats and mice. **J Biochem,** v. 102, n. 6, p. 1599-607, 1987.

KANG, P.; TIAN, C.; JIA, C. Association of RAGE gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus, diabetic retinopathy and diabetic nephropathy. **Gene,** v. 500, n. 1, p. 1-9, 2012.

KANKOVA, K.; BENES, P.; KUCHRICKOVA, S. Functional analysis of the common haplotype in the receptor for advanced glycation end-products gene previously identified as a susceptibility factor for diabetic nephropathy. **Exp Clin Endocrinol Diabetes,** v. 118, n. 2, p. 93-5, 2010.

KANKOVA, K. *et al.*Haplotype analysis of the RAGE gene: identification of a haplotype marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. **Nephrol Dial Transplant,** v. 20, n. 6, p. 1093-102, 2005.

KARAVANAKI, K. *et al.* Screening for associated autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM). **Horm Res,** v. 71, n. 4, p. 201-6, 2009.

KILPATRICK, E. S. *et al.* Plasma 1,5-anhydroglucitol concentrations are influenced by variations in the renal threshold for glucose. **Diabet Med,** v. 16, n. 6, p. 496-9, 1999.

KIM, M. J. *et al.* Evaluation of 1,5-anhydroglucitol as a marker for glycemic variability in patients with type 2 diabetes mellitus. **Acta Diabetol,** v. 50, n. 4, p. 505-10, 2013.

KIM, M. S.; POLYCHRONAKOS, C. Immunogenetics of type 1 diabetes. **Horm Res,** v. 64, n. 4, p. 180-8, 2005.

KIM, W. J.; PARK , C.-Y. 1,5-Anhydroglucitol in diabetes mellitus. v. 43, n. 1, p. 33-40, 2013.

KIRBIS, J. *et al.* The -429 T/C and -374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene (RAGE) are not risk factors for coronary artery disease in Slovene population with type 2 diabetes. **Coll Antropol,** v. 28, n. 2, p. 611-6, 2004.

KIRITOSHI, S. *et al.* Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. **Diabetes,** v. 52, n. 10, p. 2570-7, 2003.

KISHIMOTO, M. *et al.* 1,5-Anhydro-D-glucitol evaluates daily glycemic excursions in well-controlled NIDDM. **Diabetes Care,** v. 18, n. 8, p. 1156-9, 1995.

KNIP, M.; VIRTANEN, S. M.; AKERBLOM, H. K. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. **Am J Clin Nutr,** v. 91, n. 5, p. 1506S-1513S, 2010.

KOELEMAN, B. P. *et al.* Genotype effects and epistasis in type 1 diabetes and HLA-DQ trans dimer associations with disease. **Genes Immun,** v. 5, n. 5, p. 381-8, 2004.

KOGA, M. *et al.* Habitual intake of dairy products influences serum 1,5-anhydroglucitol levels independently of plasma glucose. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 90, n. 1, p. 122-5, 2010.

KOHNERT, K. D. *et al.* Chronic hyperglycemia but not glucose variability determines HbA1c levels in well-controlled patients with type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 77, n. 3, p. 420-6, 2007.

KOHNERT, K. D. *et al.* Utility of different glycemic control metrics for optimizing management of diabetes. **World J Diabetes,** v. 6, n. 1, p. 17-29, 2015.

KOHNERT, K. D. *et al.* Relationships between glucose variability and conventional measures of glycemic control in continuously monitored patients with type 2 diabetes. **Horm Metab Res,** v. 41, n. 2, p. 137-41, 2009.

KORDONOURI, O. *et al.* Predictivity of thyroid autoantibodies for the development of thyroid disorders in children and adolescents with Type 1 diabetes. **Diabet Med,** v. 19, n. 6, p. 518-21, 2002.

KOSAKA, T. Y. *et al.* Comparison of 1,5-Anhydroglucitol, HbA1c, and Fructosamine for Detection of Diabetes Mellitus. v. n. p. 1991.

KRECHLER, T. *et al.* Soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) and polymorphisms of RAGE and glyoxalase I genes in patients with pancreas cancer. **Clin Biochem,** v. 43, n. 10-11, p. 882-6, 2010.

KRISCHER, J. P. *et al.* Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 88, n. 1, p. 103-8, 2003.

KRISHNAN, S. *et al.* Impact of type 1 diabetes and body weight status on cardiovascular risk factors in adolescent children. **J Clin Hypertens (Greenwich),** v. 13, n. 5, p. 351-6, 2011.

KUCUKHUSEYIN, O. *et al.* Associations of -374T/A polymorphism of receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene in Turkish diabetic and non-diabetic patients with coronary artery disease. **In Vivo,** v. 23, n. 6, p. 949-54, 2009.

KUKKO, M. *et al.* Dynamics of diabetes-associated autoantibodies in young children with human leukocyte antigen-conferred risk of type 1 diabetes recruited from the general population. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 90, n. 5, p. 2712-7, 2005.

KYVIK, K. O.; GREEN, A.; BECK-NIELSEN, H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. **BMJ,** v. 311, n. 7010, p. 913-7, 1995.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res,** v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAING, S. P. *et al.* The British Diabetic Association Cohort Study, II: cause-specific mortality in patients with insulin-treated diabetes mellitus. **Diabet Med,** v. 16, n. 6, p. 466-71, 1999.

LANDER, H. M. *et al.* Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. **J Biol Chem,** v. 272, n. 28, p. 17810-4, 1997.

LESLIE, R. D. *et al.* Diabetes classification: grey zones, sound and smoke: Action LADA 1. **Diabetes Metab Res Rev,** v. 24, n. 7, p. 511-9, 2008.

LI, H. *et al.*Possible human leukocyte antigen-mediated genetic interaction between type 1 and type 2 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 86, n. 2, p. 574-82, 2001.

LI, J.; SCHMIDT, A. M. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. **J Biol Chem,** v. 272, n. 26, p. 16498-506, 1997.

LI, S. *et al.* Determination of glycemic monitoring marker 1,5-anhydroglucitol in plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,** v. 875, n. 2, p. 459-64, 2008.

LI, Y. M. *et al.* Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 93, n. 20, p. 11047-52, 1996.

LIBBY, P. *et al.* Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on Cardiovascular Complications of Type 1 Diabetes Mellitus. **Circulation,** v. 111, n. 25, p. 3489-93, 2005.

LIN, L.; PARK, S.; LAKATTA, E. G. RAGE signaling in inflammation and arterial aging. **Front Biosci (Landmark Ed),** v. 14, n. p. 1403-13, 2009.

LINDHOLM, E. *et al.* Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications. **PLoS One,** v. 3, n. 6, p. e2546, 2008.

LINDHOLM, E. *et al.*The -374 T/A polymorphism in the gene encoding RAGE is associated with diabetic nephropathy and retinopathy in type 1 diabetic patients. **Diabetologia,** v. 49, n. 11, p. 2745-55, 2006.

LIU, L. *et al.* Increased 1,5-anhydroglucitol predicts glycemic remission in patients with newly diagnosed type 2 diabetes treated with short-term intensive insulin therapy. **Diabetes Technol Ther,** v. 14, n. 9, p. 756-61, 2012.

LIU, L. L. *et al.* Prevalence of overweight and obesity in youth with diabetes in USA: the SEARCH for Diabetes in Youth study. **Pediatr Diabetes,** v. 11, n. 1, p. 4-11, 2010.

LIU e CLIN., I. Accepting clocks that tell time poorly:fluid-phase versus standard ELISA autoantibody assays. **Clin Immunol**. v. 125, n.2, p. 120-6. 2007

MAAHS, D. M. *et al.* Total cholesterol and high-density lipoprotein levels in pediatric subjects with type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr,** v. 147, n. 4, p. 544-6, 2005.

MAAHS, D. M. *et al.* Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am,** v. 39, n. 3, p. 481-97, 2010.

MACLAREN, N.; ATKINSON, M. Is insulin-dependent diabetes mellitus environmentally induced? **N Engl J Med,** v. 327, n. 5, p. 348-9, 1992.

MAHAJAN, N.; DHAWAN, V. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) in vascular and inflammatory diseases. **Int J Cardiol,** v. 168, n. 3, p. 1788-94, 2013.

MAHLER, B. *et al.* Puberty alters renal water handling. **Am J Physiol Renal Physiol,** v. 305, n. 12, p. F1728-35, 2013.

MANTOVANI, R. M.; MANTOVANI, L. M.; DIAS, V. M. 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, 2007.

MARASCHIN, J. D. F. *et al.*Diabetes mellitus classification. **Arq. Bras. Cardiol.,** v. 95, n. 2, p. 40-46, 2010.

MATHEUS, A. S. D. M.; COBAS, R. A.; GOMES, M. B. Dislipidemias no diabetes melito tipo 1: abordagem atual. v. n. p. 2008.

MCCANCE, D. R. *et al.* Comparison of tests for glycated haemoglobin and fasting and two hour plasma glucose concentrations as diagnostic methods for diabetes. **BMJ,** v. 308, n. 6940, p. 1323-8, 1994.

MCGILL, J. B. *et al.* Circulating 1,5-anhydroglucitol levels in adult patients with diabetes reflect longitudinal changes of glycemia: a U.S. trial of the GlycoMark assay. **Diabetes Care,** v. 27, n. 8, p. 1859-65, 2004.

MEDICA, S. B. D. E. Diabetes Mellitus: Insulinoterapia. v. n. p. 2005.

MEHTA, S. N. *et al.* Evaluation of 1,5-anhydroglucitol, hemoglobin A1c, and glucose levels in youth and young adults with type 1 diabetes and healthy controls. **Pediatr Diabetes,** v. 13, n. 3, p. 278-84, 2012.

MELIN, E. O. *et al.*Depression, obesity, and smoking were independently associated with inadequate glycemic control in patients with type 1 diabetes. **Eur J Endocrinol,** v. 168, n. 6, p. 861-9, 2013.

MENDES, T. D. A. B. *et al.*Diabetes mellitus: factors associated with prevalence in the elderly, control measures and practices, and health services utilization in São Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública,** v. 27, n. 6, p. 1233-1243, 2011.

METZGER, B. E. *et al.*Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Care,** v. 30 Suppl 2, n. p. S251-60, 2007.

MIJOVIC, C. H. *et al.* HLA-DQA1 and -DQB1 alleles associated with genetic susceptibility to IDDM in a black population. **Diabetes,** v. 40, n. 6, p. 748-53, 1991.

MIYAZAKI, M. *et al.* Comparison of diagnostic methods for diabetes mellitus based on prevalence of retinopathy in a Japanese population: the Hisayama Study. **Diabetologia,** v. 47, n. 8, p. 1411-5, 2004.

MOLTCHANOVA, E. V. *et al.*Seasonal variation of diagnosis of Type 1 diabetes mellitus in children worldwide. **Diabet Med**, v. 26, n. 7, p. 673-8, 2009.

MONNIER, V. M. *et al.* Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. **N Engl J Med,** v. 314, n. 7, p. 403-8, 1986.

MURUSSI, M. *et al.*Detecção precoce da nefropatia diabética. **Arq Bras Endrocrinol Metab,** v. n. p. 2007.

NATHAN, D. M. *et al.* Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **N Engl J Med,** v. 353, n. 25, p. 2643-53, 2005.

NATURE. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**. v. 447, p. 661-78. 2007.

NATIONAL HEALTH AND NUTRITION EXAMINATION SURVEY, J. **Outline for the results of the National Health and Nutrition Examination Survey Japna, 2007**. Disponível em: Acesso em: 23/03/2015

NEEPER, M. *et al.* Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. **J Biol Chem,** v. 267, n. 21, p. 14998-5004, 1992.

NERUP, J. *et al.*HL-A antigens and diabetes mellitus. **Lancet,** v. 2, n. 7885, p. 864-6, 1974.

NEWFIELD, R. S. *et al.* Epidemiology and genetics of diabetic complications. **Diabetologia,** v. 40 Suppl 3, n. p. B62-4, 1997.

NG, M. *et al.*Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet,**

NG, Z. X. *et al.* Association analysis of -429T/C and -374T/A polymorphisms of receptor of advanced glycation end products (RAGE) gene in Malaysian with type 2 diabetic retinopathy. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 95, n. 3, p. 372-7, 2012.

NGUYEN, T. M. *et al.* Serum 1,5-anhydroglucitol (Glycomark) levels in children with and without type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Diabetes,** v. 8, n. 4, p. 214-9, 2007.

NIELSEN, P. J. *et al.*Meta-analysis of the effect of exercise interventions on fitness outcomes among adults with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract,** Biochemistry Department, University of Missouri, Columbia, MO, United States., v. 74, n. 2, p. 111-20, 2006.

NIU, W. *et al.* A meta-analysis of receptor for advanced glycation end products gene: four well-evaluated polymorphisms with diabetes mellitus. **Mol Cell Endocrinol,** v. 358, n. 1, p. 9-17, 2012.

NOBLE, J. A. *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,** v. 59, n. 5, p. 1134-48, 1996.

NOBLE, J. A. *et al.* HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. **Diabetes,** v. 59, n. 11, p. 2972-9, 2010.

NORIE ARAKI *et al.* Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. **European Journal of Biochemistry,** v. 230, n. 35, p. 408–415, 1995.

NORRIS JM, Y. X., LAMB MM, BARRIGA K, SEIFERT J, HOFFMAN M .ET AL. . Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity
in children at increased risk for type 1 diabetes. **JAMA**. v. 298, n.12, p. 1420-8. 2007.

NOVELLI, G. *et al.*Role of genetics in prevention of coronary atherosclerosis. **Curr Opin Cardiol,** v. 18, n. 5, p. 368-71, 2003.

NOWATZKE, W. *et al.* Evaluation of an assay for serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) and determination of reference intervals on the Hitachi 917 analyzer. **Clin Chim Acta,** v. 350, n. 1-2, p. 201-9, 2004.

OIMOMI, M. *et al.* A study of the age-related acceleration of glycation of tissue proteins in rats. **J Gerontol,** v. 43, n. 4, p. B98-101, 1988.

ONKAMO, P. *et al.*Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. **Diabetologia,** v. 42, n. 12, p. 1395-403, 1999.

ORBAN, T. *et al.* Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. **Diabetes Care,** v. 32, n. 12, p. 2269-74, 2009.

ORCHARD, T. J. *et al.* Lipid and blood pressure treatment goals for type 1 diabetes: 10-year incidence data from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. **Diabetes Care,** v. 24, n. 6, p. 1053-9, 2001.

ORESIC, M. *et al.* Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. **J Exp Med,** v. 205, n. 13, p. 2975-84, 2008.

OSTMAN, J. *et al.* Gender differences and temporal variation in the incidence of type 1 diabetes: results of 8012 cases in the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden 1983-2002. **J Intern Med,** v. 263, n. 4, p. 386-94, 2008.

OUCHI, M. *et al.* Effects of sex and age on serum 1,5-anhydroglucitol in nondiabetic subjects. **Exp Clin Endocrinol Diabetes,** v. 120, n. 5, p. 288-95, 2012.

PAIVA, C. Novos Critérios de Diagnostico e classificação da diabetes mellitus. v. p. 2001. Disponível em: <http://www.spmi.pt/revista/vol07/ch6_v7n4a2000.pdf>. Acesso em: 23/03/2015.

PANI, L. N. *et al.* Effect of aging on A1C levels in individuals without diabetes: evidence from the Framingham Offspring Study and the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004. **Diabetes Care,** v. 31, n. 10, p. 1991-6, 2008.

PARIKKA, V. *et al.* Early seroconversion and rapidly increasing autoantibody concentrations predict prepubertal manifestation of type 1 diabetes in children at genetic risk. **Diabetologia,** v. 55, n. 7, p. 1926-36, 2012.

PARK, L. *et al.* Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. **Nat Med,** v. 4, n. 9, p. 1025-31, 1998.

PARK, Y. S. *et al.* Combinations of HLA DR and DQ molecules determine the susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus in Koreans. **Hum Immunol,** v. 59, n. 12, p. 794-801, 1998.

PATTERSON, C. C. *et al.* Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. **Lancet,** Epidemiology Research Group, Centre for Public Health, Queen's University Belfast, Belfast, UK. c.patterson@qub.ac.uk, v. 373, n. 9680, p. 2027-33, 2009.

PETITTI, D. B. *et al.* Serum lipids and glucose control: the SEARCH for Diabetes in Youth study. **Arch Pediatr Adolesc Med,** v. 161, n. 2, p. 159-65, 2007.

PETTERSSON-FERNHOLM, K. *et al.* The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients. **Diabetes,** v. 52, n. 3, p. 891-4, 2003.

PETTERSSON-FERNHOLM, K. *et al.* Polymorphisms in the nephrin gene and diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. **Kidney Int,** v. 63, n. 4, p. 1205-10, 2003.

PFLUEGER, M. *et al.* Age- and islet autoimmunity-associated differences in amino acid and lipid metabolites in children at risk for type 1 diabetes. **Diabetes,** v. 60, n. 11, p. 2740-7, 2011.

PICHETH, G. *et al.* The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene promoter is a protective factor against cardiovascular lesions in type 2 diabetes mellitus patients. **Clin Chem Lab Med,** , v. 45, n. 10, p. 1268-72, 2007a.

PICHETH, G. *et al.* The -429 T>C polymorphism of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) is associated with type 1 diabetes in a Brazilian population. **Clin Chim Acta,** v. 383, n. 1-2, p. 163-4, 2007b.

PIETROPAOLO, M. *et al.*Cytoplasmic islet cell antibodies remain valuable in defining risk of progression to type 1 diabetes in subjects with other islet autoantibodies. **Pediatr Diabetes,** v. 6, n. 4, p. 184-92, 2005.

PIROT, P.; CARDOZO, A. K.; EIZIRIK, D. L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metabol,** v. 52, n. 2, p. 156-65, 2008.

PITKANEN, E. *et al.*Identification of 1,5-anhydroglucitol in thin-layer chromatograms. **Scand J Clin Lab Invest,** v. 40, n. 1, p. 95-8, 1980.

PODAR, T. *et al.* Increasing incidence of childhood-onset type I diabetes in 3 Baltic countries and Finland 1983-1998. **Diabetologia,** v. 44 Suppl 3, n. p. B17-20, 2001.

POIRIER, O. *et al.* Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation end-product putative receptors. Association study with nephropathy in type 1 diabetic patients. **Diabetes,** v. 50, n. 5, p. 1214-8, 2001.

POLYCHRONAKOS, C.; LI, Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. **Nat Rev Genet,** v. 12, n. 11, p. 781-92, 2011.

POON, P. Y. *et al.* Relation between polymorphisms of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and cardiovascular diseases in Chinese patients with diabetic nephropathy. **Clin Nephrol,** v. 73, n. 1, p. 44-50, 2010.

POZZILLI, P.; BUZZETTI, R. A new expression of diabetes: double diabetes. **Trends Endocrinol Metab,** v. 18, n. 2, p. 52-7, 2007.

POZZILLI, P.; DI MARIO, U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention. **Diabetes Care,** v. 24, n. 8, p. 1460-7, 2001.

Proteína RAGE Disponível em:. HTTP://EN.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/RAGE_%28RECEPTOR%29. Acesso em: 25/02/2015

PUETT, R. C. *et al.* Neighborhood context and incidence of type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth study. **Health Place,** v. 18, n. 4, p. 911-6, 2012.

PURNELL, J. Q. *et al.* The effect of excess weight gain with intensive diabetes mellitus treatment on cardiovascular disease risk factors and atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus: results from the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study (DCCT/EDIC) study. **Circulation,** v. 127, n. 2, p. 180-7, 2013.

RAMOS, A. J. S. *et al.* Prevalência de doença tireoideana em pacientes com diabetes tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.,** v. 47, n. 02, p. 06, 2003.

RAMPRASAD, S. *et al.*Rage gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy in a clinic-based population from South India. **Eye (Lond),** v. 21, n. 3, p. 395-401, 2007.

REDDI, A. S.; CAMERINI-DAVALOS, R. A. Diabetic nephropathy. An update. **Arch Intern Med,** v. 150, n. 1, p. 31-43, 1990.

REPORT-OF-A-WORLD-HEALTH-ORGANIZATION-CONSULTATION. Use of glycated haemoglobin (HbA1C) in the diagnosis of diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 93, n. p. 11, 2011.

REWERS, M. *et al.* Celiac disease associated with type 1 diabetes mellitus. **Endocrinol Metab Clin North Am,** v. 33, n. 1, p. 197-214, xi, 2004.

ROBERTS, R. A genetic basis for coronary artery disease. **Trends Cardiovasc Med,** . 2014.

ROBERTSON, D. A. *et al.* Is serum anhydroglucitol an alternative to the oral glucose tolerance test for diabetes screening? The Mauritius Noncommunicable Diseases Study Group. **Diabet Med,** v. 10, n. 1, p. 56-60, 1993.

ROLANDSSON, O.; PALMER, J. P. Latent autoimmune diabetes in adults (MATA-CASES *et al.*) is dead: long live autoimmune diabetes! **Diabetologia,** v. 53, n. 7, p. 1250-3, 2010.

ROLDAN, M. B.; ALONSO, M.; BARRIO, R. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with Type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Nutr Metab,** v. 12, n. 1, p. 27-31, 1999.

RONNINGEN, K. S. *et al.*Distribution of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles and DQA1-DQB1 genotypes among Norwegian patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Tissue Antigens,** v. 37, n. 3, p. 105-11, 1991.

ROSENSTOCK, J. Insulin therapy: optimizing control in type 1 and type 2 diabetes. **Clin Cornerstone,** v. 4, n. 2, p. 50-64, 2001.

ROWE, P. A. *et al.* The pancreas in human type 1 diabetes. **Semin Immunopathol,** v. 33, n. 1, p. 29-43, 2011.

RUDERMAN, N. B.; WILLIAMSON, J. R.; BROWNLEE, M. Glucose and diabetic vascular disease. **FASEB J,** v. 6, n. 11, p. 2905-14, 1992.

RUDOFSKY, G., JR. *et al.* A 63bp deletion in the promoter of rage correlates with a decreased risk for nephropathy in patients with type 2 diabetes. **Exp Clin Endocrinol Diabetes,** v. 112, n. 3, p. 135-41, 2004.

SACKS, D. B. *et al.* Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin Chem,** v. 57, n. 6, p. e1-e47, 2011.

SANTIN, I.; EIZIRIK, D. L. Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and beta-cell apoptosis. **Diabetes Obes Metab,** v. 15 Suppl 3, n. p. 71-81, 2013.

SARWAR, N. *et al.*Markers of dysglycaemia and risk of coronary heart disease in people without diabetes: Reykjavik prospective study and systematic review. **PLoS Med,** v. 7, n. 5, p. e1000278, 2010.

SAUDEK, C. D.; DERR, R. L.; KALYANI, R. R. Assessing glycemia in diabetes using self-monitoring blood glucose and hemoglobin A1c. **JAMA,** v. 295, n. 14, p. 1688-97, 2006.

SCHEUNER, M. T. Genetic predisposition to coronary artery disease. **Curr Opin Cardiol,** v. 16, n. 4, p. 251-60, 2001.

SCHIPPER, R. F. *et al.* HLA class II associations with Type 1 diabetes mellitus: a multivariate approach. **Tissue Antigens,** v. 57, n. 2, p. 144-50, 2001.

SCHMIDT, A. M. *et al.* Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 91, n. 19, p. 8807-11, 1994.

SCHMIDT, A. M. *et al.* Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. **Arterioscler Thromb,** Department of Medicine, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York, NY 10032., v. 14, n. 10, p. 1521-8, 1994.

SCHMIDT, A. M.; STERN, D. A radical approach to the pathogenesis of diabetic complications. **Trends Pharmacol Sci,** , v. 21, n. 10, p. 367-9, 2000.

SCHMIDT, A. M.; STERN, D. M. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. **Trends Endocrinol Metab,** , v. 11, n. 9, p. 368-75, 2000.

SCHMIDT AM, V. M., GERLACH M, BRETT J, RYAN J, KAO J, ESPOSITO C, HEGARTY H, HURLEY W, CLAUSS M, ET AL. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. **J Biol Chem,** v. 267, n. 21, p. 14987-14997, 1992.

SCHMIDT, A. M. *et al.* Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. **J Clin Invest,** Department of Physiology, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York 10032., v. 91, n. 5, p. 2155-68, 1993.

SCHMIDT, A. M. *et al.* Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. **Circ Res,** v. 84, n. 5, p. 489-97, 1999.

SEISSLER, J.; SCHERBAUM, W. A. Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus. **Clin Chem Lab Med,** v. 44, n. 2, p. 133-7, 2006.

SELVIN, E. *et al.* Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in nondiabetic adults. **N Engl J Med,** v. 362, n. 9, p. 800-11, 2010.

SERVICE, F. J.; O'BRIEN, P. C. Influence of glycemic variables on hemoglobin A1c. **Endocr Pract,** v. 13, n. 4, p. 350-4, 2007.

SERVO, C.; PALO, J.; PITKANEN, E. Polyols in the cerebrospinal fluid and plasma of neurological, diabetic and uraemic patients. **Acta Neurol Scand,** v. 56, n. 2, p. 111-6, 1977.

SHE, J. X. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. **Immunol Today,** v. 17, n. 7, p. 323-9, 1996.

SHIBASAKI, S.; IMAGAWA, A.; HANAFUSA, T. Fulminant type 1 diabetes mellitus: a new class of type 1 diabetes. **Adv Exp Med Biol,** v. 771, n. p. 20-3, 2012.

SHICHIRI, M.; IWAMOTO, H.; SHIIGAI, T. Diabetic renal hypouricemia. **Arch Intern Med,** v. 147, n. 2, p. 225-8, 1987.

SILVA, M. E.; 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, 2008.

SILVEIRA, V. M. F. *et al.* Uma Amostra de Pacientes com Diabetes Tipo 1 no Sul do Brasil
Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 45, n. 5, p. 2001.
SINGH, R. *et al.* Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia,** v. 44, n. 2, p. 129-46, 2001.

SKOG, O. *et al.*Revisiting the notion of type 1 diabetes being a T-cell-mediated autoimmune disease. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes,** v. 20, n. 2, p. 118-23, 2013.

SNELL-BERGEON, J. K. *et al.* Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH Case-Control study. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 95, n. 6, p. 2868-76, 2010.

SOCIEDADE-BRASILEIRA-DE-DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2012-2013**. 2012.

SODERSTROM, U.; AMAN, J.; HJERN, A. Being born in Sweden increases the risk for type 1 diabetes - a study of migration of children to Sweden as a natural experiment. **Acta Paediatr,** v. 101, n. 1, p. 73-7, 2012.

SOEDAMAH-MUTHU, S. S. *et al.*Lipoprotein subclass measurements by nuclear magnetic resonance spectroscopy improve the prediction of coronary artery disease

in Type 1 diabetes. A prospective report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. **Diabetologia,** v. 46, n. 5, p. 674-82, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009. **Diabetes**, 2009.

SOLTESZ, G. *et al.* Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology? **Pediatr Diabetes,** v. 8 Suppl 6, n. p. 6-14, 2007.

SORCI, G. *et al.*RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. **Biochim Biophys Acta,** v. 1833, n. 1, p. 101-9, 2013.

SORO-PAAVONEN, A. *et al.* Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. **Diabetes,** v. 57, n. 9, p. 2461-9, 2008.

SOUZA, O. L. R. *et al.*Prevalence of thyroid autoimmunity in a group of patients with type 1 diabetes mellitus from Londrina, PR. **Arq Bras Endocrinol Metab,** v. 49, n. 2, p. 228-233, 2005.

STANKOV, K.; BENC, D.; DRASKOVIC, D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. **Pediatrics,** v. 132, n. 6, p. 1112-22, 2013.

STECK, A. K. *et al.* Stepwise or linear decrease in penetrance of type 1 diabetes with lower-risk HLA genotypes over the past 40 years. **Diabetes,** v. 60, n. 3, p. 1045-9, 2011.

STENE, L. C.; REWERS, M. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the enterovirus link to type 1 diabetes: critical review of human studies. **Clin Exp Immunol,** v. 168, n. 1, p. 12-23, 2012.

STERN, D. M. *et al.* Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. **Ageing Res Rev,** v. 1, n. 1, p. 1-15, 2002.

SUGAYA, K. *et al.* Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. **Genomics,** v. 23, n. 2, p. 408-19, 1994.

SUN, J. *et al.* Correlation between 1,5-anhydroglucitol and glycemic excursions in type 2 diabetic patients. **Chin Med J (Engl),** v. 124, n. 22, p. 3641-5, 2011.

SVOREN, B. M. *et al.* Significant vitamin D deficiency in youth with type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr,** v. 154, n. 1, p. 132-4, 2009.

TANAKA, S. *et al.* High performance liquid chromatographic determination of 1,5-anhydroglucitol in human plasma for diagnosis of diabetes mellitus. **Biomed Chromatogr,** v. 6, n. 2, p. 63-6, 1992.

TANG, Z. H.; ZENG, F.; ZHANG, X. Z. Human genetics of diabetic nephropathy. **Ren Fail,** v. n. p. 1-9, 2015.

TAPP, R. J. *et al.* Diagnostic thresholds for diabetes: the association of retinopathy and albuminuria with glycaemia. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 73, n. 3, p. 315-21, 2006.

THE-DIABETES-CONTROL-AND-COMPLICATIONS-TRIAL-RESEARCH-GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **N Engl J Med,** v. 329, n. 14, p. 977-86, 1993.

THE-EXPERT-COMMITTEE-ON-THE-DIAGNOSIS-AND-CLASSIFICATION-OF-DIABETES-MELLITUS. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care,** v. 20, n. 7, p. 1183-97, 1997.

THOMAS, M. C. *et al.* Soluble receptor for AGE (RAGE) is a novel independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in type 1 diabetes. **Diabetologia,** v. 54, n. 10, p. 2669-77, 2011.

THOMSON, G. *et al.* Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. **Tissue Antigens,** v. 70, n. 2, p. 110-27, 2007.

THORNALLEY, P. J. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand),** v. 44, n. 7, p. 1013-23, 1998.

THORSBY, E.; UNDLIEN, D. The HLA associated predisposition to type 1 diabetes and other autoimmune diseases. **J Pediatr Endocrinol Metab,** v. 9 Suppl 1, n. p. 75-88, 1996.

THUNANDER, M. *et al.* Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 82, n. 2, p. 247-55, 2008.

TODD, J. A. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. **Immunol Today,** Nuffield Department of Surgery, John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford, UK., v. 11, n. 4, p. 122-9, 1990.

TODD, J. A. Etiology of type 1 diabetes. **Immunity,** v. 32, n. 4, p. 457-67, 2010.

TRIOLO, T. M. *et al.*Additional autoimmune disease found in 33% of patients at type 1 diabetes onset. **Diabetes Care,** v. 34, n. 5, p. 1211-3, 2011.

TSUGAWA, Y. *et al.* Should the hemoglobin A1c diagnostic cutoff differ between blacks and whites? A cross-sectional study. **Ann Intern Med,** v. 157, n. 3, p. 153-9, 2012.

TSUKUI, S.; FUKUMURA, Y.; KOBAYASHI, I. Decreased serum 1,5-anhydroglucitol in nondiabetic subjects with a family history of NIDDM. **Diabetes Care,** v. 19, n. 9, p. 940-4, 1996.

TSUKUI, S.; KOBAYASHI, I. Effects of age and obesity on glycated haemoglobin and 1,5-anhydroglucitol in screening for type 2 diabetes mellitus. **Diabet Med,** v. 12, n. 10, p. 899-903, 1995.

TUOMI, T. Type 1 and type 2 diabetes: what do they have in common? **Diabetes,** v. 54 Suppl 2, n. p. S40-5, 2005.

UMEDA, F. *et al.*Serum 1,5-anhydro-D-glucitol and glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Tohoku J Exp Med,** v. 163, n. 2, p. 93-100, 1991.

USHER-SMITH, J. A. *et al.* Factors associated with the presence of diabetic ketoacidosis at diagnosis of diabetes in children and young adults: a systematic review. **BMJ,** v. 343, n. p. d4092, 2011.

USHER-SMITH, J. A. *et al.* The pathway to diagnosis of type 1 diabetes in children: a questionnaire study. **BMJ Open,** v. 5, n. 3, p. e006470, 2015.

VALABHJI, J. *et al.* Rates of cholesterol esterification and esterified cholesterol net mass transfer between high-density lipoproteins and apolipoprotein B-containing lipoproteins in Type 1 diabetes. **Diabet Med,** v. 19, n. 5, p. 424-8, 2002.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol,** v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol Rev,** v. 91, n. 1, p. 79-118, 2011.

VAN LEEUWEN, A.; POELHUIS-LETH, D.; BLADH, M. **Davis's Comprehensive Handbook of Laboratory and Diagnostic Tests With Nursing Implications**., 2013.

VELLOSO, L. A.; EIZIRIK, D. L.; CNOP, M. Type 2 diabetes mellitus--an autoimmune disease? **Nat Rev Endocrinol,** v. 9, n. 12, p. 750-5, 2013.

VESTBERG, D. *et al.* Relationship between overweight and obesity with hospitalization for heart failure in 20,985 patients with type 1 diabetes: a population-based study from the Swedish National Diabetes Registry. **Diabetes Care,** v. 36, n. 9, p. 2857-61, 2013.

VLASSARA, H.; BUCALA, R.; STRIKER, L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. **Lab Invest,** , v. 70, n. 2, p. 138-51, 1994.

VLASSARA, H.; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation endproducts. **J Intern Med,** v. 251, n. 2, p. 87-101, 2002.

WAITZFELDER, B. *et al.* Adherence to guidelines for youths with diabetes mellitus. **Pediatrics,** v. 128, n. 3, p. 531-8, 2011.

WANG, Y. *et al.* A study on the association of serum 1,5-anhydroglucitol levels and the hyperglycaemic excursions as measured by continuous glucose monitoring system among people with type 2 diabetes in China. **Diabetes Metab Res Rev,** v. 28, n. 4, p. 357-62, 2012.

WATKINS.R.A *et al.*Established and emerging biomarkers for the prediction of type 1 diabetes: a systematic review. **Translational Research,** v. 164, n. 2, p. 2014.

WAUTIER, J. L. *et al.* Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. **J Clin Invest,** v. 97, n. 1, p. 238-43, 1996.

WAUTIER, M. P. *et al.* Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 280, n. 5, p. E685-94, 2001.

WENDT, T. M. *et al.* RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Am J Pathol,** v. 162, n. 4, p. 1123-37, 2003.

WENZLAU, J. M. *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 104, n. 43, p. 17040-5, 2007.

WHITE, N. H. *et al.* Beneficial effects of intensive therapy of diabetes during adolescence: outcomes after the conclusion of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). **J Pediatr,** v. 139, n. 6, p. 804-12, 2001.

WILKIN, T. J. The accelerator hypothesis: a review of the evidence for insulin resistance as the basis for type I as well as type II diabetes. **Int J Obes (Lond),** v. 33, n. 7, p. 716-26, 2009.

WINKLER, C. *et al.* An interferon-induced helicase (IFIH1) gene polymorphism associates with different rates of progression from autoimmunity to type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 60, n. 2, p. 685-90, 2011.

WINTER, W. E.; SCHATZ, D. A. Autoimmune markers in diabetes. **Clin Chem,** v. 57, n. 2, p. 168-75, 2011.

WHITACKER;, F. C. F. *et al.*Prevalência e aspectos clínicos da associação de diabetes melito tipo 1 e doença celíaca. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 52, p. 2008.

WON, J. C. *et al.* 1,5-Anhydroglucitol reflects postprandial hyperglycemia and a decreased insulinogenic index, even in subjects with prediabetes and well-controlled type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 84, n. 1, p. 51-7, 2009.

WONG, F. S.; WEN, L. What can the HLA transgenic mouse tell us about autoimmune diabetes? **Diabetologia,** v. 47, n. 9, p. 1476-87, 2004.

YAMAGISHI, S. *et al.* Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. **Diabetologia,** v. 41, n. 12, p. 1435-41, 1998.

YAMAGISHI, S. *et al.* Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. **Biochim Biophys Acta,** v. 1820, n. 5, p. 663-71, 2012.

YAMAMOTO, Y. *et al.* Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. **J Clin Invest,** v. 108, n. 2, p. 261-8, 2001.

YAMANOUCHI, T. *et al.* Reduction of plasma 1,5-anhydroglucitol (1-deoxyglucose) concentration in diabetic patients. **Diabetologia,** v. 31, n. 1, p. 41-5, 1988.

YAMANOUCHI, T.; AKANUMA, Y. Serum 1,5-anhydroglucitol (1,5 AG): new clinical marker for glycemic control. **Diabetes Res Clin Pract,** v. 24 Suppl, n. p. S261-8, 1994.

YAMANOUCHI, T. *et al.* Comparison of 1,5-anhydroglucitol, HbA1c, and fructosamine for detection of diabetes mellitus. **Diabetes,** Japan., v. 40, n. 1, p. 52-7, 1991.

YAMANOUCHI, T. *et al.* Plasma 1,5-anhydro-D-glucitol as new clinical marker of glycemic control in NIDDM patients. **Diabetes,** v. 38, n. 6, p. 723-9, 1989.

YAMANOUCHI, T. *et al.* Estimation of plasma glucose fluctuation with a combination test of hemoglobin A1c and 1,5-anhydroglucitol. **Metabolism,** v. 41, n. 8, p. 862-7, 1992.

YAMANOUCHI, T. *et al.* Clinical usefulness of serum 1,5-anhydroglucitol in monitoring glycaemic control. **Lancet,** v. 347, n. 9014, p. 1514-8, 1996.

YAMANOUCHI, T. *et al.* Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body. **Am J Physiol,** v. 263, n. 2 Pt 1, p. E268-73, 1992.

YANG Y, S. P. Lessons on autoimmune diabetes from animal models. **Clin Sci (Lond)**. v. 110, n.6, p. 627-39. 2006.

YEUNG, W. C.; RAWLINSON, W. D.; CRAIG, M. E. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. **BMJ,** v. 342, n. p. d35, 2011.

YOON, S. J. *et al.* Association of RAGE gene polymorphisms with coronary artery disease in the Korean population. **Coron Artery Dis,** v. 18, n. 1, p. 1-8, 2007.

YU, K. *et al.* Methionine synthase A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. **Eur J Hum Genet,** v. 18, n. 3, p. 370-8, 2010.

ZEE, R. Y. *et al.* Polymorphisms in the advanced glycosylation end product-specific receptor gene and risk of incident myocardial infarction or ischemic stroke. **Stroke,** v. 37, n. 7, p. 1686-90, 2006.

ZIEMER, D. C. *et al.* Glucose-independent, black-white differences in hemoglobin A1c levels: a cross-sectional analysis of 2 studies. **Ann Intern Med,** v. 152, n. 12, p. 770-7, 2010.