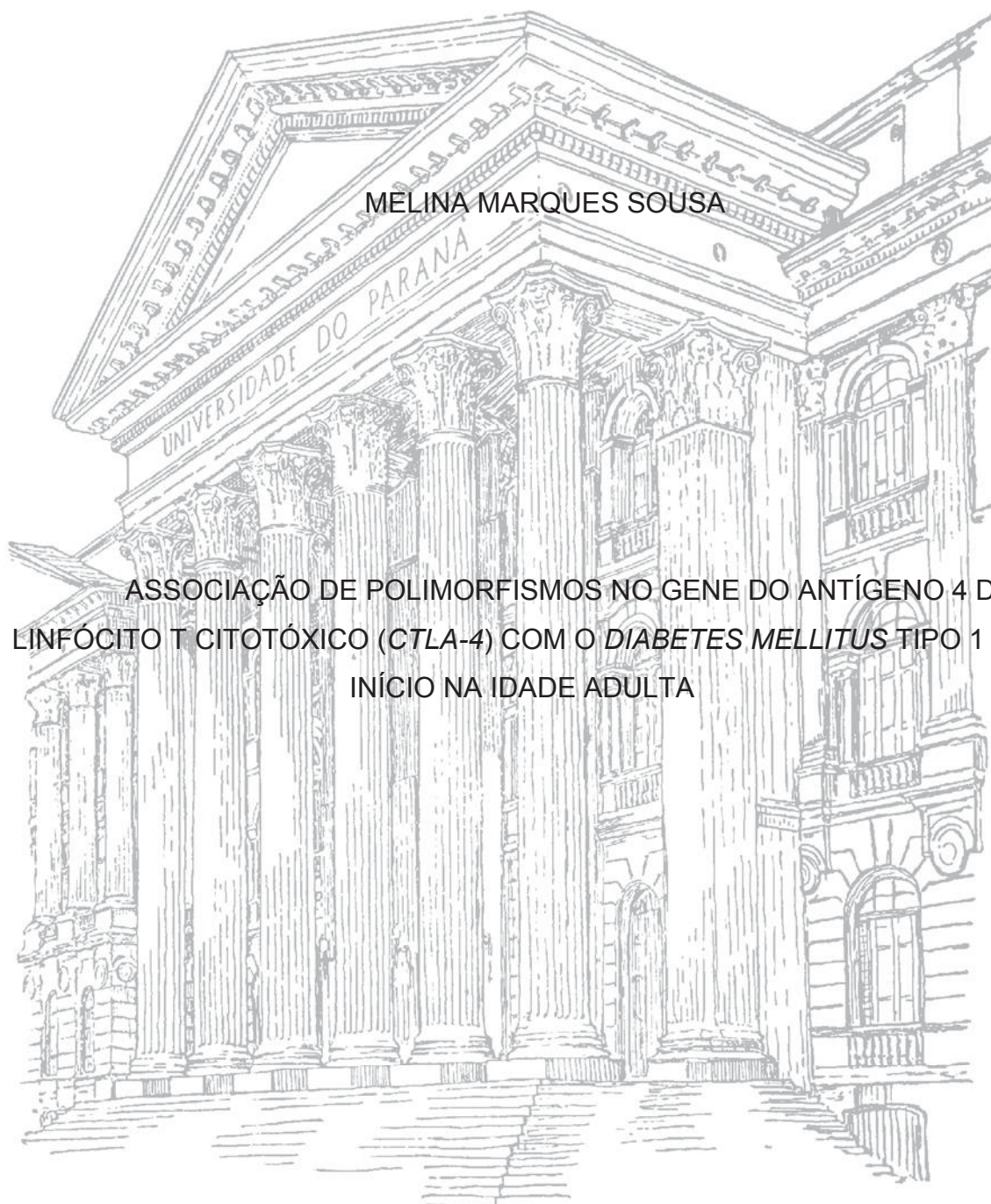


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MELINA MARQUES SOUSA

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DO ANTÍGENO 4 DO
LINFÓCITO T CITOTÓXICO (CTLA-4) COM O *DIABETES MELLITUS* TIPO 1 DE
INÍCIO NA IDADE ADULTA



CURITIBA

2019

MELINA MARQUES SOUSA

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DO ANTÍGENO 4 DO
LINFÓCITO T CITOTÓXICO (*CTLA-4*) COM O *DIABETES MELLITUS* TIPO 1 DE
INÍCIO NA IDADE ADULTA

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, setor de Ciências da Saúde,
da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiane Gomes de Moraes
Rego
Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2019

Sousa, Melina Marques

Associação de Poliformismos no Gene do Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico (*CTLA-4*) com o *Diabetes mellitus* tipo 1 de Início na Idade Adulta (recurso eletrônico) / Melina Marques Sousa – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientadora: Professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego
Coorientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

1. *Diabetes mellitus* tipo 1. 2. Polimorfismos. 3. Gene *CTLA-4*.
4. Variação genética. I. Rego, Fabiane G.M. II. Picheth, Geraldo.
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.462

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MELINA MARQUES SOUSA** intitulada: **Associação de polimorfismos no gene do antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4) com o Diabetes mellitus tipo 1 de início na idade adulta**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Fevereiro de 2019.

FABIANE GOMES DE MORAES REGO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MAUREN ISFER ANGHEBEM OLIVEIRA
Avaliador Externo (PUC/PR)

IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a Buda, e aos anjos de proteção por traçarem minha caminhada tão peculiar em busca de um melhor despertar.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo ensinamento.

Agradeço a minha orientadora, a professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego por me proporcionar o conhecimento do real significado do mestrado e de toda a sua amplitude.

Agradeço à professora Dra. Dayane Alberton, pela orientação no estágio de docência, e também por partilhar seu tempo, espaço, experiência, amizade e respeito.

Ao meu co-orientador, o professor Dr. Geraldo Picheth agradeço pelos conhecimentos obtidos através de pronta disposição em auxiliar-me nos momentos necessários e determinantes deste projeto.

Aos membros da Banca examinadora, as Professoras Doutoras: Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss e Mauren Isfer Anghebem pelo respeito e disponibilidade em contribuírem no meu aprendizado.

Aos meus colegas de laboratório agradeço pelos momentos em que se fizeram presentes.

Aos amigos de vida, que tanto amo e que preenchem meu coração como jamais poderia imaginar. Transformaram pensamentos, minha alma se encheu de luz com a amizade de todos vocês. Não poderia em tempo algum deixar de exaltá-los e em especial agradeço a suprema importância de Louryana Padilha de Campos e de Vanessa Graciolo - "irmãs por escolha", como de Lucio de Assis Araújo Neto - "irmão por escolha". Tão especiais e inigualáveis são também Luana Chweih, Maick Baptista, Gabriela Parchen, Marco Freitas, Alcindo Junior, Nayana, Fernando, Flavio, Luiza, Jean e Thanise pela conexão, afinidade e imensa alegria em conhecê-los. Susan Webber e Bruna Martins agradeço a acolhida, vocês são queridas por toda ajuda, parceria e transformação pessoal, além de paciência e confiança.

A ti Paulo Eduardo Júnior, agradeço por uma conexão jamais esperada, que não consigo explicar nesta fase da minha vida, sendo uma benção de Deus e que me deu forças para continuar acreditando que há pessoas iluminadas no mundo.

Finalmente aos meus familiares, mãe querida Maria Iolanda, tia Landa, às irmãs Marta Carolina e Mariana e ao sobrinho tão amado e desejado Pedro, assim com ao cão de estimação Binho pelo incentivo e companheirismo imprescindíveis.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

“Todo karma prejudicial alguma vez cometido por mim, desde tempos imemoráveis, devido a minha ganância, raiva e ignorância, nascido de meu corpo, boca e mente agora de tudo eu me arrependo.”

Buda

“Não deixe ninguém tirar a sua paz,
nem dependa de ninguém para se sentir feliz.

Esses sentimentos estão dentro de você.”

Buda.

RESUMO

O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é uma patologia complexa que está associada a processos autoimunes, fatores ambientais e genéticos. Estudos indicam que os genes de susceptibilidade ao DM1 estão relacionados com o aumento da resposta imune. O Cromossomo 2q33 parece estar envolvido em doenças autoimunes e inclui o gene do *Antígeno 4 Associado Ao Linfócito T Citotóxico* – *CTLA-4*, o qual regula a função e atividade dos linfócitos T. Polimorfismos neste gene foram associados com DM1 em várias populações. O presente estudo é caracterizado como caso-controle, realizado em uma população Brasileira adulta, onde foi avaliado a associação dos polimorfismos rs231775 e rs5792909 no gene *CTLA-4* com DM1. As correlações da variabilidade genética com os marcadores bioquímicos também foram analisadas. Estes polimorfismos foram genotipados em 143 pacientes com DM1 com diagnóstico após 18 anos e 150 indivíduos saudáveis, utilizando a metodologia de PCR-RFLP (rs5792909) e a sondas fluorescentes TaqMan® (rs231775) para a genotipagem. O projeto teve aprovação do comitê de ética da UFPR (CAAE: 01038112.0.0000.0102). Os polimorfismos em estudo estavam no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foi observada a diferença de frequência genotípica e alélica entre os grupos analisados. A frequência do alelo G (95%IC) do polimorfismo rs231775 foi de 37,4% (32-43%) e 39,3% (34-45%); e para o alelo T do polimorfismo rs5792909 foi de 5,7% (3-8%) e 2,8% (1-5%), em indivíduos com DM1 e grupo controle, respectivamente. Os polimorfismos estudados no gene *CTLA-4* não foram associados ao DM1 na população Sul brasileira adulta.

Palavras chave: *Diabetes mellitus* tipo 1, polimorfismos, *CTLA-4*, variante genética.

ABSTRACT

Type 1 *Diabetes mellitus* (T1D) is a complex pathology that is associated with autoimmune processes, environmental and genetic factors. Studies related that the genes susceptible to T1D are related to the high immune response. The 2q33 chromosome appears to be involved in autoimmune diseases and includes the *Antigen 4 Associated with the Cytotoxic T Lymphocyte Gene - CTLA-4*, which regulates the function and activity of T lymphocytes. Polymorphisms in this gene have been associated with T1D in various populations. The present study was performed as a case-control in an adult Brazilian population, which was genotyping rs231775 and rs5792909 polymorphisms in the *CTLA-4* gene and analyzed with T1D. Correlations of genetic variability with biochemical markers also analyzed. These polymorphisms were genotyped in 143 patients with T1D diagnosed after 18 years and 150 healthy adults by PCR - RFLP (rs5792909) and TaqMan® fluorescence probes (rs231775). The ethics committee of UFPR approved this project (CAAE: 01038112.0.0000.0102). The polymorphisms under study were in the Hardy-Weinberg equilibrium. The genotypic and allelic frequency were not different between the studied groups. The frequency of the G allele (95% CI) of the rs231775 polymorphism was 37.4% (32-43%) and 39.3% (34-45%); and for the T allele of the polymorphism rs5792909 was 5.7% (3-8%) and 2.8% (1-5%), for T1D patients and control group, respectively. Both polymorphisms studied in the *CTLA-4* gene were not associated with T1D in the adult Southern Brazilian population.

Key words: Type 1 *Diabetes mellitus*, polymorphisms, *CTLA-4*, genetic variant.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMO DE RESPOSTA AUTOIMUNE A PARTIR DA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS LINFOCITÁRIAS T.....	24
FIGURA 2. DESREGULAÇÃO TÍMICA E EVENTOS PERIFÉRICOS QUE CULMINAM EM INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE ILHOTAS.....	27
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA CTLA-4.....	38
FIGURA 4. MODELO FUNCIONAL DE CTLA-4.....	41
FIGURA 5. CROMOSSOMO 2 E A REGIÃO DE POSICIONAMENTO DO GENE <i>CTLA-4</i>	44
FIGURA 6. FLUXOGRAMA DO PROJETO.....	47
FIGURA 7. SÍTIO DE RESTRIÇÃO DA ENZIMA ENDONUCLEASE <i>MSE I</i>	52
FIGURA 8. MAPA DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO E GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA <i>MSE I</i> PARA O POLIMORFISMO rs5742909.....	79
FIGURA 9. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO DA ENZIMA <i>MSEI</i> PARA O POLIMORFISMO rs 5742909 DO GENE <i>CTLA-4</i>	80

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.....	49
QUADRO 2. PROTOCOLO PARA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS FLUORESCENTES.....	51
QUADRO 3. CONDIÇÕES PARA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA REGIÃO POLIMÓRFICA DO GENE <i>CTLA-4</i>	52
QUADRO 4. PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DO POLIMORFISMO rs5742909 NO GENE <i>CTLA-4</i>	53
QUADRO 5. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, METODOLOGIAS, E INTERVALO DE REFERÊNCIA PARA ADULTOS SAUDÁVEIS.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS ADULTOS CONTROLES SAUDÁVEIS E PACIENTES DM1.....	56
TABELA 2 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS EM ESTUDO.....	65
TABELA 3 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs231775 DO GENE <i>CTLA-4</i> , NAS AMOSTRAS EM ESTUDO.....	73
TABELA 4 - POLIMORFISMO rs231775 DO GENE <i>CTLA-4</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	75
TABELA 5 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs5742909 DO GENE <i>CTLA-4</i> NAS AMOSTRAS EM ESTUDO.....	81
TABELA 6 - POLIMORFISMO rs5742909 DO GENE <i>CTLA-4</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,5-AG	1,5 anidroglucitol
Ac	Auto anticorpos
ADA	<i>American Diabetes Association</i> – Associação Americana de Diabetes
APC	Células Apresentadoras de antígenos
CAD	Cetoacidose diabética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
sCTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico – forma solúvel
fCTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico – forma completa
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM1A	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1A autoimune
DM1B	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1B idiopática
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> gestacional
GAD65	Ácido glutâmico descarboxilase de 65 kDa
HbA1c	Hemoglobina glicada
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> - Antígeno leucocitário humano
H-W	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IA-2	<i>Islet Antigen 2</i> – Autoanticorpos anti-tirosina fosfatase 2

IAA	Autoanticorpos contra insulina
ICA	Autoanticorpos anti-ilhotas beta pancreáticas
IDF	International Diabetes Federation
IFN- γ	Interferon Gama
IGg	Imunoglobulina g
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INS-VNTR	Insulina – número variável de frequências repetidas
LADA	Diabetes autoimune latente em adultos
LDL-C	<i>Low Density Lipoprotein</i> – <i>Cholesterol</i> – Colesterol LDL
MHC	Complexo histocompatibilidade principal
MODY	<i>Maturity onset diabetes of the Young</i> - Diabetes da maturidade de início precoce
NOD	Nonobese
OMS	Organização Mundial de Saúde (WHO)
pb	Pares de Base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
OMS	Organização Mundial de Saúde

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
PTPN22	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor Type 22</i> – Proteína tirosina fosfatase não receptora 22
rs	<i>Reference Sequence</i> - Identificação dos Polimorfismos
SEMPR	Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas - UFPR
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> - Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T
Teff	Células linfocitárias T efetoras
TGF	Taxa de filtração glomerular
TNF- α	<i>Tumoral Necrose Factor α</i> - Fator de Necrose Tumoral α
Treg	Células linfocitárias T reguladoras
TYK2	Proteína tirosina quinase tipo 2
UFPR	Universidade Federal do Paraná

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 <i>DIABETES mellitus</i>	19
2.2 <i>DIABETES mellitus</i> TIPO 1	23
2.3 SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA DO DM1	35
2.3.1 ANTÍGENO 4 ASSOCIADO AO LINFÓCITO T CITOTÓXICO (<i>CTLA-4</i>)	37
3. METODOLOGIA	47
3.1 AMOSTRAS	48
3.2 EXTRAÇÃO DO DNA.....	48
3.3 POLIMORFISMOS ALVOS DO ESTUDO	49
3.4 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (TAQMAN®).....	49
3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PCR - RFLP.....	51
3.6 DOSAGENS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DADOS ANTROPOMÉTRICOS.....	53
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	56
4.1.1 Idade, Gênero e Etnia.....	57
4.1.2 Peso, Altura e IMC	58
4.1.3 Histórico familiar de DM	59
4.1.4 Tabagismo	59
4.1.5 Hipertensão, DAC, IAM e dislipidemia.....	61

4.1. 6 Nefropatia.....	63
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	64
4.2.1 Biomarcadores de Controle Glicêmico (glicemia em jejum, HbA1c e 1,5AG).....	64
4.2.2 Perfil Lipídico e análise do índice aterogênico do plasma – IAP	66
4.2.3 Biomarcadores de Estado Nutricional (albumina e proteínas totais)	69
4.2.4 Perfil Renal (ácido úrico, creatinina e ureia).....	69
4.2.4 Perfil Hepático (ALT, AST e GGT).....	71
4.3 ANÁLISES MOLECULARES.....	72
4.3.1 Polimorfismo rs231775 (+49AG) do gene <i>CTLA-4</i>.....	72
4.3.2 Polimorfismo rs5742909 (-318 C/T) do gene <i>CTLA-4</i>	78
5. CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	128
ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	130
ANEXO 3 – PLANILHA DE COLETA DE DADOS.....	132
ANEXO 4 – GRÁFICO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA.....	133

1. INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) constitui a forma mais prevalente de diabetes em crianças e jovens adultos. Resulta da destruição autoimune das ilhotas pancreáticas produtoras de insulina dirigida pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ em indivíduos geneticamente susceptíveis (BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010; TODD, 2010; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014), resultando em hiperglicemia e suas complicações relacionadas (DONAGHUE *et al.*, 2009).

Existe um componente genético forte na patogênese do DM1, evidenciado por seu agrupamento em famílias e pelas contribuições de diversas variantes gênicas de susceptibilidade à patogênese (DAVIES *et al.*, 1994; TODD *et al.*, 2007; CONCANNON; RICH; NEPOM, 2009). Pode-se citar o *locus* do antígeno leucocitário humano (HLA), em particular a região de classe II (DR e DQ), o qual contribui com 40 a 50% do agrupamento familiar do DM1 (JULIER *et al.*, 1991; DAVIES *et al.*, 1994; AL-JENAI DI *et al.*, 2005); e os vários *loci* de susceptibilidade não HLA, mapeados por varredura do genoma (COX *et al.*, 2001; TODD *et al.*, 2007) ou pela abordagem de genes candidatos (JULIER *et al.*, 1991; UEDA *et al.*, 2003; BOTTINI *et al.*, 2004). Entre as variantes genéticas incluem-se as localizadas na região promotora do gene que codifica a insulina, que aparentemente modulam a tolerância imunológica pelo controle da expansão do *pool* de células autoreativas (PUGLIESE; MICELI, 2002), e a glicoproteína transmembrana coestimulatória antígeno 4 do linfócito T citotóxico (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 - CTLA-4*), que possui papel central na regulação da imunidade destas células (CARRENO *et al.*, 2000; WELLS *et al.*, 2001; VAIDYA; PEARCE, 2004).

Variantes polimórficas no gene *CTLA-4* foram associadas ao DM1 primeiramente em uma população Italiana (NISTICO *et al.*, 1996), e posteriormente, através de estudos do tipo caso-controle desenvolvidos com famílias (UEDA *et al.*, 2003; VAIDYA; PEARCE, 2004; KAVVOURA; IOANNIDIS, 2005; DOUROUDIS *et al.*, 2009). Estas associações foram detectadas em diferentes grupos étnicos (MARRON *et al.*, 1997; TURPEINEN *et al.*, 2003; DOUROUDIS *et al.*, 2009), e parecem ser seletivas para as populações Caucasianas (UEDA *et al.*, 2003; TODD *et al.*, 2007; CONCANNON *et al.*, 2009) e estar ausente em populações não Caucasianas (KOSMACZEWSKA *et al.*, 2001; BANIASADI *et al.*, 2006; CAPUTO *et al.*, 2007; BALIC *et al.*, 2009; JUNG *et al.*,

2009). Um estudo realizado envolvendo 2.300 famílias com pares de irmãos afetados pelo DM1 demonstrou que entre os 24 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) genotipados no gene *CTLA-4*, apenas os polimorfismos +49A/G (rs231775) e CT60A/G (rs3087243) foram constantes entre as combinações haplotípicas analisadas (QU *et al.*, 2009).

Outro SNP foi determinado na posição -318 da região promotora, embora este polimorfismo não afete a sequência na região reguladora do promotor (HEWARD *et al.*, 1998), foi demonstrado que o -318CT está associado a uma maior atividade promotora na expressão desta molécula e, conseqüentemente, um maior controle para a atividade imunológica exagerada (WANG *et al.*, 2002).

No presente estudo, foi investigado a associação de duas variantes comuns no gene *CTLA-4* (rs231775 e rs5742909) com DM1 em uma população Sul-Brasileira.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a associação entre a variabilidade genética de sítios polimórficos no gene *CTLA-4* com DM1 e correlacionar e biomarcadores séricos em uma população adulta de Euro-Brasileiros.

1.1.2 Objetivos específicos

- Quantificar os biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico, função renal e função hepática em indivíduos saudáveis (controle) e portadores de DM1;
- Genotipar os polimorfismos rs231775 e rs5742909 do gene *CTLA-4* em em indivíduos saudáveis (controle) e portadores de DM1;
- Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs231775 e rs5742909 do gene *CTLA-4*;
- Associar as variações genéticas identificadas nos grupos estudados com os dados clínicos e com os parâmetros bioquímicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

O *Diabetes mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia e associadas a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos e tecidos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos (SBD, 2017). Pode resultar de defeitos de secreção e/ou ação da insulina envolvendo processos patogênicos específicos, por exemplo, destruição das células β pancreáticas, resistência à ação da insulina, distúrbios da sua secreção, entre outros (ADA, 2019b).

Como a classificação do diabetes é feita de acordo com sua etiologia, termos como “diabetes insulino dependente” e “diabetes insulino independente” não devem mais ser utilizados. Foram adotadas pela OMS (WHO, 2016) e ADA quatro classes clínicas: *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) - subclasses 1A e 1B, *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) e outros tipos mais específicos (SBD, 2017; ADA, 2019b).

Na história natural do DM, alterações fisiopatológicas estão presentes antes que os valores glicêmicos atinjam concentrações supranormais, condição na qual os valores glicêmicos estão acima dos valores de referência, mas ainda abaixo dos valores diagnósticos de DM, denomina-se este estado como pré-diabetes (ADA, 2019b). Na maioria dos casos de pré-diabetes, a doença é assintomática e o diagnóstico deve ser feito com base nos exames laboratoriais. Mesmo o DM estando presente do ponto de vista laboratorial, seu diagnóstico clínico pode tardar pelo fato de a doença ser oligossintomática em grande parte dos casos. Dessa forma o rastreamento clínico na presença dos fatores de risco é muito importante (SBD, 2017).

As categorias de tolerância à glicose têm sido definidas utilizando-se como critério a glicemia plasmática, tanto pelo valor da glicemia em jejum ou pelo valor da glicemia após 2 horas de ingestão de solução anidra (teste de tolerância oral à glicose). Utiliza-se também como critério complementar a dosagem de hemoglobina glicada HbA1c (INTERNATIONAL EXPERT, 2009; SBD, 2017; ADA, 2019a):

- Glicemia em jejum (ausência de ingestão calórica durante período mínimo de 8 horas) ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/l);
- Glicemia 2 horas após ingestão de 75 g de glicose anidra dissolvida em água ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/l);
- Hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$. A determinação da HbA1c deve ser realizada pelo método padronizado pelo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) (GRANT *et al.*, 2009) e certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP);
- Glicemia aleatória ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/l) em paciente com sintomas clássicos de hiperglicemia (poliúria, polidipsia, perda de peso) ou em crise hiperglicêmica.

A confirmação do diagnóstico de DM requer repetição dos exames laboratoriais alterados, sendo ideal repetir o mesmo exame alterado em segunda amostra de sangue, na ausência de sintomas inequívocos de hiperglicemia. Pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia, tais como poliúria, polidipsia, polifagia e emagrecimento, devem ser submetidos à dosagem de glicemia ao acaso e independente do jejum, não havendo necessidade de confirmação por meio de segunda dosagem caso se verifique glicemia aleatória ≥ 200 mg/dL (SBD, 2017; ADA, 2019a).

Os critérios diagnósticos para DM1 são semelhantes aos utilizados no DM2. No primeiro caso, porém, a sintomatologia é mais evidente que no segundo caso (SBD, 2017), uma vez que costumam apresentar concentrações de glicose sanguínea marcadamente elevada, sendo que um terço dos indivíduos DM1 são diagnosticados com cetoacidose severa (DABELEA; REWERS; *et al.*, 2014). Contudo, como a progressão da disglucemia pode ser rápida em pacientes com DM1, a HbA1c é menos sensível para o diagnóstico do que às dosagens de glicemia em jejum ou glicemia estimulada (ADA, 2019a). Como o DM1 é uma doença autoimune, pode ser detectado pela presença de auto-anticorpos contra as ilhotas pancreáticas. Mais de 90% dos indivíduos com DM1 recém diagnosticados possuem um ou mais auto-anticorpos, como os auto-anticorpos contra as ilhotas (*islet cell autoantibodies* – ICA), autoanticorpos contra a insulina (*insulin autoantibodies* - IAA), autoanticorpos contra ácido glutâmico descarboxilase (*glutamic acid decarboxylase* - GAD65) e autoanticorpos anti-tirosina fosfatase IA2 (*insulinoma-associated autoantigen 2* - IA2A) (ATKINSON; EISENBARTH;

MICHELS, 2014; KATSAROU *et al.*, 2017). Embora se acredite que o DM1 seja tipicamente diagnosticado durante a infância, estudos estimam que aproximadamente metade de todos os novos casos diagnosticados de DM1 ocorre na fase adulta quando os indivíduos encontram-se entre os 20 e 30 anos de idade (MOLBAK *et al.*, 1994; VANDEWALLE; COECKELBERGHS; *et al.*, 1997; VANDEWALLE; FALORNI; *et al.*, 1997; THUNANDER *et al.*, 2008). Cerca de 5 a 15% dos adultos diagnosticados com DM2 podem ter DM1 com auto-anticorpos de ilhotas presentes (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). Assim, o paradigma tradicional de que o DM1 ocorre apenas na infância e o DM2 apenas na fase adulta não é mais acurado, ambas as doenças ocorrem em ambos os grupos de idade (ADA, 2019a).

Tem sido a presença de auto-anticorpos que tem permitido distinguir o DM1, LADA e o DM2 (GUELHO; PAIVA; CARVALHEIRO, 2013). Os anticorpos anti-insulina, constituem um marcador específico do DM1, pela sua raridade em adultos. Doentes com múltiplos anticorpos identificados ou elevados títulos de anticorpos anti-GAD, apresentam uma aproximação gradual às características fenotípicas do DM1 – menor idade ao diagnóstico, menor concentração de peptídeo C, maior probabilidade de necessitar de insulina exógena, bem como maior probabilidade de associação de outros processos autoimunes (HARRISON, 2001). Os Acs anti-GAD e Acs anti-IA-2 constituem 60% dos auto-anticorpos anti-ilhotas pancreáticas identificados em pessoas com DM1; sugerindo a existência de outros antígenos ainda não caracterizados (SEISLER *et al.*, 1998). Aproximadamente 50% das pessoas com DM1 sem auto-anticorpos identificados são portadores de alelos de alto risco, alertando para a presença de auto-imunidade atualmente indetetável apenas pela pesquisa de anticorpos. Ao longo dos anos identificou-se a reatividade das células T às múltiplas proteínas das ilhotas. A presença de células T reativas correlaciona-se diretamente com a disfunção pancreática. Estas identificam os indivíduos com maior lesão da célula β (HEROLD *et al.*, 2009).

Estima-se que cerca de 425 milhões de pessoas em todo o mundo, ou 8,8% dos adultos entre 20 e 79 anos, tenham diabetes. Cerca de 79% vivem em países de baixa e média renda. O número de pessoas com diabetes aumenta para 451 milhões se a idade for ampliada para 18-99 anos. Se essas tendências continuarem, em 2045, 693 milhões de pessoas entre 18 e 99 anos, ou 629

milhões de pessoas entre 20 e 79 anos, terão diabetes. O Brasil é o país da América Central e do Sul que apresenta o maior número de pessoas com DM (12,5, 11,4-13,5 milhões) (IDF, 2017a).

O DM1 constitui uma das doenças crônicas mais comuns em crianças (ZYLKE; DEANGELIS, 2007). Existem 1,1 milhão de crianças e adolescentes com DM1 no mundo e no Brasil anualmente 9,6 novos casos ocorrem entre jovens com idades entre 0-19 anos (IDF, 2017a). O DM1 contribui para 98% do DM em crianças nas faixas etária entre 0-10 anos de idade 87% dos casos entre 11-19 anos de idade (DABELEA; MAYER-DAVIS; *et al.*, 2014; MAYER-DAVIS; DABELEA; LAWRENCE, 2017).

Muitos estudos revelam uma variação pronunciada da tendência da incidência de DM1 com a idade. O DM1 na infância tem uma incidência aumentada com a idade e atinge seu pico entre 10 à 14 anos de idade (XIA *et al.*, 2019), com apenas limitada inconsistência de estudos (WOJCIK *et al.*, 2015; FERNANDEZ-RAMOS *et al.*, 2017; SHALTOUT *et al.*, 2017) relatando uma incidência entre 5 à 9 anos de idade. Por outro lado, a incidência de DM1 diminui após os 14 anos de idade, e tal tendência de declínio persiste na idade adulta (DIAZ-VALENCIA; BOUGNERES; VALLERON, 2015).

Grandes diferenças na incidência de DM1 foram relatadas em diferentes grupos étnicos e geográficos em todo o mundo. Um grande estudo do projeto DIAMOND mostrou uma grande variação na incidência de DM1 entre as populações, variando de 0,1 por 100.000/ano na China e Venezuela; até oposto com média de 40,9 casos por 100.000/ano na Finlândia (MEDICINE, D. P. G. J. D., 2006; MEDICINE, N.-S. S. I. J. N. E. J. O., 2009; IDF, 2017b). Estas diferenças significativas na prevalência de DM1 em muitas populações diferentes em todo o mundo podem ser devido a fatores ambientais aos quais essas populações estão expostas e/ou fatores genéticos, assim como diferenças étnicas entre as populações estudadas (HUBER *et al.*, 2008).

Globalmente, está havendo aumento da incidência e prevalência do DM1, com um aumento na incidência de aproximadamente 2-3% por ano (MAAHS *et al.*, 2010; MAYER-DAVIS; DABELEA; LAWRENCE, 2017). O Brasil ocupa o terceiro lugar no mundo em prevalência de DM1 em crianças e adolescentes, estima-se o

país possua mais de 30 mil portadores de DM1 com menos de 20 anos de idade (IDF, 2017b).

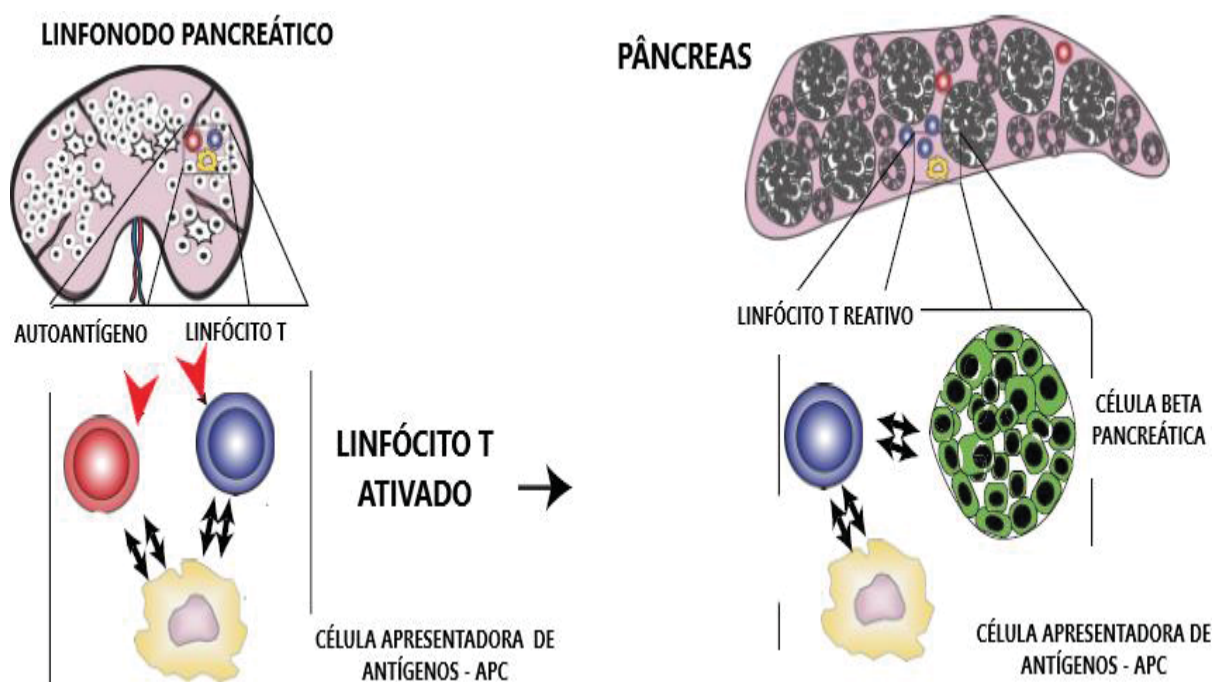
2.2. DIABETES MELLITUS TIPO 1

O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela inflamação crônica das ilhotas pancreáticas de Langerhans (BACH, 1994; TISCH; MCDEVITT, 1996; EISENBARTH, 2004; ANDERSON; BLUESTONE, 2005). A inflamação das ilhotas é tipicamente marcada por infiltração de efetores imunes adaptativos e inatos. A insulite progride ao longo do tempo e quando uma quantidade suficiente de massa de células β se torna não funcional e/ou destruída, os níveis hiperglicêmicos são atingidos e o diabetes clínico é estabelecido. Os mecanismos imunes que medeiam a auto-imunidade das células β são heterogêneos, como refletido pela natureza do infiltrado das ilhotas e pela idade do início clínico (FERREIRA-HERMOSILLO; MOLINA-AYALA, 2015). No entanto, o DM1 é geralmente visto como uma doença autoimune induzida por células T, o tipo mais prevalente e agressivo de DM1, o que se desenvolve em crianças e adolescentes (CLARK; KROGER; TISCH, 2017). Um subtipo de DM1 células T independente, no entanto também pode existir, mas acredita-se ser amplamente mediado por efetores imunes inatos (IN'T VELD, 2011; SKOG *et al.*, 2013).

A positividade de auto-anticorpos é o primeiro sinal detectável de uma resposta autoimune em curso (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011); embora não se acredite que os auto-anticorpos sejam os fatores causadores da patogênese do DM1 (GAN; ALBANESE-O'NEILL; HALLER, 2012). Resumidamente, para o desenvolvimento da resposta imune do DM1 existem três pré-requisitos: 1º) Ativação de células linfocitárias T; 2º) Infiltrado inflamatório; e 3º) Falha na regulação da resposta imune (WALLBERG; COOKE, 2013) (Figura 1). Uma injúria desencadeante de reação auto-imune irá sinalizar às células β pancreáticas a liberação de auto-antígenos intracelulares (moléculas pró-insulina); que serão atraídos por células apresentadoras de antígenos (APCs) nos gânglios linfáticos. Este complexo celular (APC - INSULINA) é transferido por drenagem para o tecido do pâncreas. Sendo assim, o infiltrado imunológico local sinaliza a ação reativa dos linfócitos T e B (GILLESPIE, 2006). Linfócitos B são apresentados, por intermédio de receptores de IgM ou IgD, aos antígenos

intracelulares. Por co-estimulação das células linfocitárias T auxiliares Th1 e Th2, os linfócitos B são transformados em plasmócitos secretores de IgG. Assim ocorre a formação dos auto-anticorpos pela primeira vez (fase de soro conversão) (FERREIRA-HERMOSILLO; MOLINA-AYALA, 2015).

FIGURA 1. MECANISMO DE RESPOSTA AUTOIMUNE A PARTIR DA ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS LINFOCITÁRIAS T.



Desenvolvimento da resposta autoimune: Interação no interior do linfonodo pancreático das células apresentadoras de antígeno na cor amarela – APCs - com o auto-antígeno (insulina) na cor vermelha. Neste local ocorre a primeira sensibilização do linfócito T – célula azul. Através de drenagem linfática, este infiltrado imunológico se instala no tecido do pâncreas para desenvolver resposta reativa com a posterior destruição do agente agressor, neste caso, células β pancreáticas produtoras de insulina (células verdes).

Fonte: Adaptado de FIFE, BLUESTONE (2008).

Além disso, a proliferação e migração de células auxiliares TCD8⁺ no pâncreas induzem a geração de uma segunda onda de destruição das células β pancreáticas e este ataque envolve perforinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e Interferon gama (IFN- γ) causando o fenômeno conhecido como pseudoatrofia com presença de infiltrado inflamatório. Mais uma vez, mais antígenos intracelulares são liberados para os gânglios linfáticos e as especificidades dos linfócitos B e T (fenômeno de dispersão epitópica – falha na regulação imunológica)

são aumentadas, causando mais destruição (FERREIRA-HERMOSILLO; MOLINA-AYALA, 2015). Neste ponto, a resposta atenuante dos linfócitos T regulatórios diminui o ataque por um curto período de tempo, durante o qual uma breve fase de proliferação de células β pancreáticas (favorecida paradoxalmente pelo ambiente favorável ocasionado por citocinas locais) se desenvolve. Este período é clinicamente conhecido como uma "lua de mel" e, eventualmente, resulta em autoimunidade (FERREIRA-HERMOSILLO; MOLINA-AYALA, 2015).

Os eventos que resultam na perda de tolerância específica para as células β e inflamação crônica das ilhotas são complexos, e influenciados por fatores genéticos e ambientais (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011; ATKINSON, 2012; KATSAROU *et al.*, 2017).

O DM1 é poligênico, com mais de 20 *loci* genéticos *Diabetes mellitus* insulino dependentes (*insulin-dependent diabetes mellitus* - IDDM) identificados e associados ao risco aumentado ou diminuído de DM1 (POCIOT; MCDERMOTT, 2002; CONCANNON *et al.*, 2005; BARRETT *et al.*, 2009; POCIOT *et al.*, 2010; NOBLE; ERLICH, 2012; ONENGUT-GUMUSCU *et al.*, 2015). A associação genética mais forte é com o locus do antígeno leucocitário humano (IDDM1), em particularmente o haplótipo das classes I e II, consistente com o papel chave para as células T no DM1 (SINGAL; BLAJCHMAN, 1973; NERUP *et al.*, 1974). Vários genes que regulam a imunobiologia das células T, B e imunidade inata também estão ligados ao DM1, assim como as variantes genéticas intrínsecas às células β , que afetam de maneira deletéria a função das células β e/ou as respostas à inflamação (NISTICO *et al.*, 1996; MORAHAN *et al.*, 2001; FIELD *et al.*, 2002; UEDA *et al.*, 2003; BOTTINI *et al.*, 2004; SMYTH *et al.*, 2004; DOOLEY *et al.*, 2016).

A identidade e o papel dos fatores ambientais no DM1 são pouco compreendidos. A hipótese mais comum é que as infecções microbianas iniciam e/ou exacerbam a inflamação das ilhotas em indivíduos geneticamente suscetíveis (FILIPPI; VON HERRATH, 2008; OP DE BEECK; EIZIRIK, 2016). Por exemplo, o DM1 está associado a enterovírus como o coxsackievirus B1 (SCHULTE *et al.*, 2010; LAITINEN *et al.*, 2014; OIKARINEN *et al.*, 2014; RICHARDSON *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2015). A infecção viral das células β pode resultar em citólise direta e/ou provocar inflamação local que inicia e/ou conduz à auto-imunidade (YLIPAASTO *et al.*, 2004; DOTTA *et al.*, 2007; KROGVOLD *et al.*, 2015). A microbiota intestinal

também tem um profundo efeito regulador na auto-imunidade das células β (VAARALA; ATKINSON; NEU, 2008; KNIP; SILJANDER, 2016). No rato diabético não obeso (*nonobese diabetic* - NOD), um modelo espontâneo de DM1, a destruição de células β pode ser promovida ou evitada por alterações na composição da microbiota intestinal (WEN *et al.*, 2008; MARKLE *et al.*, 2013). Aqui, pensa-se que os componentes e metabólitos bacterianos afetam a activação e/ou o estado de diferenciação dos efectores imunitários inatos e adaptativos. Estudos longitudinais de indivíduos em risco também indicam um papel para a microbiota intestinal em indivíduos humanos com DM1 (DE GOFFAU *et al.*, 2013; ENDESFELDER *et al.*, 2014; KOSTIC *et al.*, 2015).

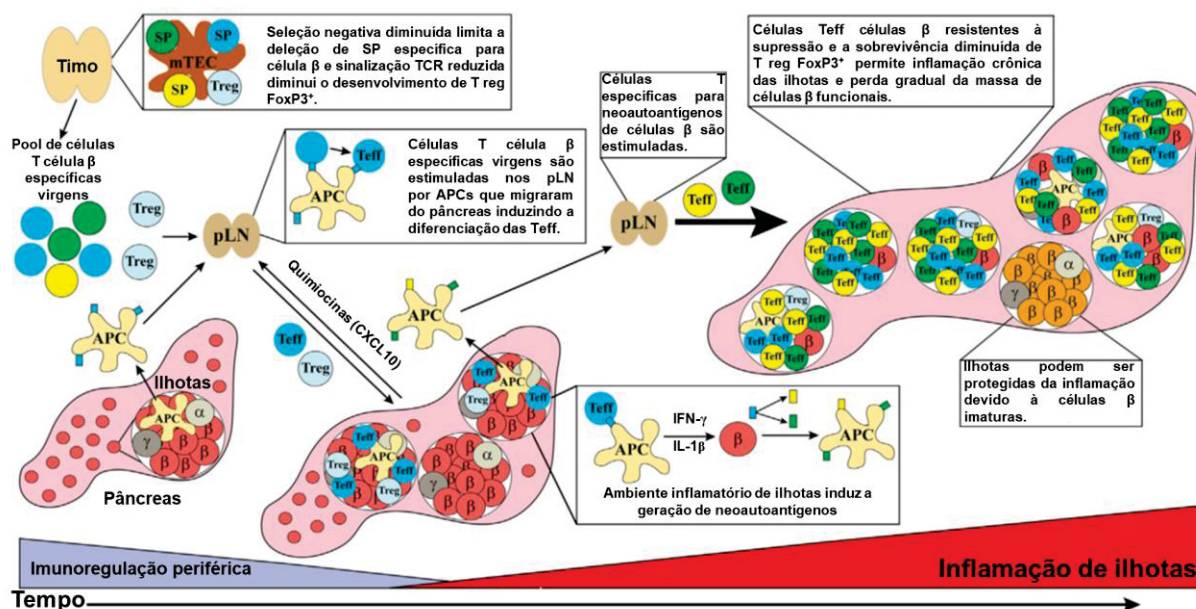
Os eventos relacionados à célula T que impulsionam a inflamação crônica das ilhotas em DM1 resultam da desregulação da tolerância central e periférica, alterações no processamento do auto-antígeno e respostas de células β modificadas (Figura 2).

A geração de um repertório de recetor de células T (TCR) autorreativo na periferia é estabelecido em parte por seleção negativa ineficiente de timócitos (células T em desenvolvimento no timo) anti-auto-simples positivos (SP) no timo (KLEIN *et al.*, 2014; TAKABA; TAKAYANAGI, 2017). No início da ontogenia, a seleção negativa é relaxada, resultando em maior fuga de anti-auto-SP (GUERAU-DE-ARELLANO *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2013; KROGER; WANG; TISCH, 2016). Esta diminuição temporal na seleção negativa e sobrevivência dos tipos de clones células β específicos podem ajudar a explicar a predominância de início do DM1 na infância. Com o tempo, mudanças na organização estrutural do timo e maturação das células apresentadoras de antígenos (APCs) tímicos leva a uma seleção negativa mais eficiente e aumento da morte de SP autorreativa (HE *et al.*, 2013).

Os principais mediadores da seleção negativa são as células epiteliais tímicas medulares (*medullary thymic epithelial cells* - mTEC) e as células dendríticas (*dendritic cells* - DC). Notadamente, a expressão de mTEC e apresentação de vários antígenos específicos de tecido (*tissue-specific antigens* - TSA) (DERBINSKI *et al.*, 2001; ANDERSON *et al.*, 2002; LISTON *et al.*, 2003; ANDERSON; SU, 2016). O reconhecimento de complexos MHC-auto-peptídicos com aumentada avididade/afinidade resulta em elevada sinalização TCR e apoptose de SP. A desregulação da seleção negativa gera um conjunto de células T

autoreativas na periferia apresentando maior avidéz/afinidade e provavelmente um aumentado potencial patológico.

FIGURA 2. DESREGULAÇÃO TÍMICA E EVENTOS PERIFÉRICOS QUE CULMINAM NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA DE ILHOTAS.



Geralmente o diabetes manifesto resulta da perda gradual da função das células β produtoras de insulina devido à um ambiente inflamatório dirigido pela infiltração de células T autorreativas e células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cell* – APC). Embora os clones de células T específicos para células β sejam detectados tanto nos indivíduos susceptíveis saudáveis como nos indivíduos DM1, um número grande de outros fatores promovem o desenvolvimento do DM1 nos pacientes. Pode-se citar a eficiência diminuída de seleção negativa no timo devido à expressão alterada de antígenos tecido específico ou devido à sinalização de receptores de células T (*T cell receptor* - TCR), permitindo o aumento do escape de clones de células T específicas para células β para a periferia. Adicionalmente, o desenvolvimento de células T regulatórias (T reg) Foxp3⁺ subotimizado devido à desregulação na sinalização dos TCR. Na periferia, células T são estimuladas nos nódulos linfáticos pancreáticos (*pancreatic lymph nodes* - pLN) pelas células APCs derivadas das ilhotas levando à diferenciação das células T efetoras (*effector T cell* - Teff). Estas células Teff patogênicas então infiltram-se nas ilhotas e conduzem à inflamação levando à redução da função e/ou sobrevivência das células β . Nem todas as ilhotas são potencialmente infiltradas devido a um fenótipo imaturo e reduzido de auto-antígenos de células β . A inflamação das ilhotas em curso também leva à geração de neoautoantígenos diretamente nas células β ou durante o processamento do antígeno pela APC. A apresentação de auto-antígenos promove a ativação e expansão de pools adicionais de Teff. Esses eventos amplificam e conduzem um estado crônico de inflamação das ilhotas levando a uma massa celular β funcional comprometida e ao início clínico do DM1.

Fonte: Adaptado de CLARK, KROGER, TISCH (2017).

Fatores tanto intrínsecos como extrínsecos influenciam a eficiência da seleção negativa aos timócitos e foram associados ao desenvolvimento de células

T específicas para células β e DM1. Entre os fatores intrínsecos relatados em ratos *NOD* incluem a redução da sensibilidade do SP à apoptose e alteração da diferenciação dos timócitos duplo positivo (DP) para SP (KISHIMOTO; SPRENT, 2001; LISTON *et al.*, 2004; ZUCHELLI *et al.*, 2005; MINGUENEAU *et al.*, 2012). Em humanos, a sinalização TCR necessária para conduzir a apoptose das SP específicas de célula β pode ser limitada por uma variante do gene que codifica a proteína tirosina fosfatase não-receptora 22 (*protein tyrosine phosphatase non-receptor 22 - PTPN22*) e que foi associada ao DM1 (BOTTINI *et al.*, 2004; SMYTH *et al.*, 2004). *PTPN22* é um regulador negativo da sinalização TCR, e a elevada atividade de fosfatase da *PTPN22* parece reduzir a força de sinalização do TCR e diminuir a indução de apoptose em SP (VANG *et al.*, 2005). Uma atividade aumentada *PTPN22* também pode limitar o desenvolvimento tímico de células T $CD4^+$ regulatórias específicas para células β que expressam FoxP3⁺ (Treg FoxP3⁺), que é dependente de reconhecimento de auto-peptídeos com alta avidéz/afinidade. Entre os fatores extrínsecos nos timócitos que impactam na seleção negativa incluem a expressão aberrante de TSA (antígenos tecido específicos) na medula. A importância da expressão e apresentação de TSA tímica é evidenciada em ratos e humanos deficientes do regulador do fator de transcrição auto-imunidade (*transcription factor autoimmune regulator - AIRE*) (ABRAMSON; HUSEBYE, 2016; ANDERSON; SU, 2016). A falta de AIRE, o qual dirige a expressão de TSA selecionados pelas células epiteliais tímicas (mTEC), resulta em seleção negativa tímica ineficiente e desenvolvimento reduzido de Treg Foxp3⁺ tecido específico, resultando na auto-imunidade de múltiplos órgãos em camundongos (ZUKLYS *et al.*, 2000; RAMSEY *et al.*, 2002; ARICHA *et al.*, 2011; LEI *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2015). De maneira similar a expressão e função aberrante de AIRE em humanos resulta no desenvolvimento de candidíase poliendócrina autoimune e displasia ectodérmica (*autoimmune polyendocrinology candidiasis and ectodermal dysplasia - APECED*), na qual uma variedade de órgãos são alvos das células T, e notadamente um subgrupo de pacientes APECED desenvolvem DM1 (FINNISH-GERMAN, 1997; NAGAMINE *et al.*, 1997; VIGLIETTA *et al.*, 2002).

Vale ressaltar que células T específicas para células β circulantes são detectadas em indivíduos saudáveis, provavelmente refletindo em parte a eficiência reduzida da seleção negativa tímica no início da ontogenia. No entanto, o fenótipo de células T específicas para células β circulantes é distinto em pacientes com

DM1 quando comparado com os indivíduos saudáveis andamento (VIGLIETTA *et al.*, 2002; ARIF *et al.*, 2004; MONTI *et al.*, 2007; VELTHUIS *et al.*, 2010; LUCE *et al.*, 2011; SKOWERA *et al.*, 2015). O primeiro exhibe principalmente um fenótipo efetor/memória e expressão de citocinas pró-inflamatórias compatíveis com autoimunidade de células β em andamento (VIGLIETTA *et al.*, 2002; ARIF *et al.*, 2004; MONTI *et al.*, 2007; LUCE *et al.*, 2011; SKOWERA *et al.*, 2015). Estes achados indicam que, além do repertório do TCR, outros fatores contribuem para a diferenciação e expansão de células T efetoras (Teff) diabetogênicas (CLARK; KROGER; TISCH, 2017).

O início da inflamação nas ilhotas tanto em camundongos *NOD* como em humanos é mal definido. Em camundongos *NOD*, acredita-se que o remodelamento pancreático logo após o nascimento desempenhe um papel fundamental no início da resposta diabetogênica (FINEGOOD; SCAGLIA; BONNER-WEIR, 1995; ST-ONGE; WEHR; GRUSS, 1999). O remodelamento do pâncreas resulta em uma onda de apoptose de células β e liberação de antígenos que são endocitados por macrófagos residentes e DC (GAGNERAULT *et al.*, 2002). Estas APC então se encaminham para os gânglios linfáticos pancreáticos (pLN) drenantes para ativar (prime) as células T específicas de células β e promover a diferenciação das Teff (TURLEY *et al.*, 2003; ROTONDI *et al.*, 2007). Uma vez estabelecidas, as Teff migram para as ilhotas e medeiam a inflamação (RHODE *et al.*, 2005; ROTONDI *et al.*, 2007; SARKAR *et al.*, 2012).

Acredita-se que mudanças na composição da microbiota intestinal no início da ontogênese também parece desempenhar um papel fundamental na regulação da diferenciação das Teff tanto em ratos como em seres humanos. A liberação sistêmica de produtos derivados da microbiota pode ativar as APCs que, por sua vez, ativam as células T específicas de células β , fornecendo um "gatilho ambiental" para incitar o desenvolvimento de DM1 (KNIP; SILJANDER, 2016).

Ambas as células T $CD4^+$ e $CD8^+$ são requeridas para a destruição eficiente das células β em camundongos *NOD* (CHRISTIANSON; SHULTZ; LEITER, 1993). As células T $CD8^+$ de ilhotas primariamente medeiam a destruição das células β por uma interação cognata envolvendo perforina e morte mediada por granzima B e morte ligante mediada Fas-Fas (ROEP, 2003; PANG *et al.*, 2009). Por outro lado, as células T $CD4^+$ das ilhotas conduzem a destruição das células β de maneira imparcial através da secreção de citocinas pró-inflamatórias. As células T $CD4^+$ e

CD8⁺ também são detectadas em ilhotas de indivíduos diabéticos, células T CD8⁺ frequentemente predominantes (ROEP, 2003; COPPIETERS *et al.*, 2012). Diversos auto-antígenos de células β são reconhecidos pelas células T infiltrantes de ilhotas, e um número destes é similarmente direcionado nas respostas diabetogênicas em humanos e ratos, incluindo o ácido glutâmico descarboxilase 65, pró-insulina, cadeia β da insulina, antígeno 2 de ilhotas e relacionado à subunidade catalítica da proteína glicose-6-fosfatase específica de ilhotas (MALLONE; BREZAR; BOITARD, 2011).

A maioria das células T CD4⁺ e CD8⁺ infiltrantes de ilhotas de camundongos *NOD* e indivíduos DM1 exibem um fenótipo efetor de células T auxiliares 1 (Th1), marcado pela secreção de IFN γ (WALKER; VON HERRATH, 2016). Um aumento de células Th17 são observadas nas ilhotas de camundongos *NOD* e nos nódulos linfáticos pancreáticos (pLN) de indivíduos DM1 (FERRARO *et al.*, 2011; KURIYA *et al.*, 2013; WALKER; VON HERRATH, 2016). O papel das células Th17 na mediação da inflamação nas ilhotas, no entanto, é mal definido. Acredita-se que concentrações locais elevadas de IFN γ estabeleçam uma alça de alimentação positiva que dirige a patologia das ilhotas. Estudos baseados em camundongos *NOD*, mostram que a secreção de IFN γ pelas células T efetoras CD4⁺ (e CD8⁺) de ilhotas resulta na regulação local positiva de sinais quimiostáticos que induzem a migração para as ilhotas de células adicionais T, B e inatas, bem como a retenção destes efetores nas ilhotas (MARTIN *et al.*, 2016; WALKER; VON HERRATH, 2016). IFN γ também ativa as APCs residentes de ilhotas e células estromais para elevar a produção de mediadores inflamatórios adicionais, tais como espécies reativas de oxigênio, os quais prejudicam o funcionamento das células β , a função e medeiam sua necrose (YOON; JUN; SANTAMARIA, 1998; CNOP *et al.*, 2005; PANG *et al.*, 2009). Além disso, o IFN γ no contexto de IL-1 β e TNF α induz apoptose das células β (YOON; JUN; SANTAMARIA, 1998; CNOP *et al.*, 2005).

Acredita-se que defeitos intrínsecos nas células Teff também possam facilitar a inflamação crônica nas ilhotas. Variantes do gene *CTLA-4* estão ligadas à susceptibilidade ao DM1 em humanos (IDDM12) e em camundongos *NOD* (Idd5.1) (NISTICO *et al.*, 1996; ANJOS, S. *et al.*, 2002). *CTLA-4* se liga às moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 expressas nas APCs, é um regulador negativo da ativação e proliferação das células T (UEDA *et al.*, 2003). Polimorfismos na região do gene *CTLA-4* humano estão associados à redução dos níveis de RNAm e uma

diminuição na expressão das isoformas solúveis de CTLA-4 (sCTLA-4) (NISTICO *et al.*, 1996; ANJOS, S. *et al.*, 2002; UEDA *et al.*, 2003). sCTLA-4 também regula negativamente a sinalização TCR. Acredita-se que o efeito da redução da expressão de CTLA-4 e sCTLA-4 facilitaria a expansão de células T específicas de células β (NISTICO *et al.*, 1996; ANJOS, S. *et al.*, 2002; UEDA *et al.*, 2003). Este cenário é consistente com a auto-imunidade exacerbada contra as células β observada em camundongos *NOD* expressando um transgene TCR diabetogênico e com falta de expressão de *CTLA-4* (LUHDER *et al.*, 2000). As células Teff derivadas de indivíduos DM1 e camundongos *NOD* exibem também sensibilidade reduzida para a supressão mediada por células Treg Foxp3⁺ (D'ALISE *et al.*, 2008; SCHNEIDER, A. *et al.*, 2008). Em suma, o culminar de uma variedade fatores extrínsecos e intrínsecos permitem que as células Teff se expandam, persistam e, por sua vez, amplifiquem a inflamação na ilhota.

Além das células Teff serem resistentes aos mecanismos regulatórios que limitam sua expansão e função, evidências indicam que o *pool* de células Treg Foxp3⁺ está comprometido no DM1 (TANG *et al.*, 2008; XUFRE *et al.*, 2013). Acredita-se que a desregulação da homeostase das células Treg Foxp3⁺ permita a diferenciação preferencial e expansão das células Teff patogênicas β -específicas. As células Treg Foxp3⁺ tem um papel essencial na regulação homeostase imune e reatividade ao próprio (BRUNKOW *et al.*, 2001; WILDIN; SMYK-PEARSON; FILIPOVICH, 2002; FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; COLLISON *et al.*, 2010). A falta de desenvolvimento tímico das células Treg Foxp3⁺ devido à expressão ou função deficiente do fator de transcrição FoxP3, resulta em auto-imunidade sistêmica em ratos e humanos. As células Treg Foxp3⁺ medeiam a supressão das células T e outros efetores imunes através de múltiplos mecanismos, incluindo a supressão dependente de contato celular e secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF β 1 e IL-35) e mediadores (adenosina) (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). As células Treg Foxp3⁺ também funcionam como um “depósito” de IL-2 para privar as células Teff de IL-2 necessária para expansão (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Este último é mediado pela expressão constitutiva de CD25, a subunidade α do receptor de IL-2 (IL-2R) (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Portanto, as células Treg Foxp3⁺ expressando IL-2R de alta afinidade são capazes de competir com as células Teff por IL-2 que transitoriamente expressam IL-2R de alta afinidade.

Concentrações aumentadas de citocinas pró-inflamatórias, como IFN γ e IL-6, que regulam negativamente a expressão de FoxP3 $^+$ também podem promover a desdiferenciação das células Treg Foxp3 $^+$ de ilhotas em um subconjunto de células similares às Teff (BAILEY-BUCKTROUT; BLUESTONE, 2011; LU; BARBI; PAN, 2017). Estes eventos levam a uma perda progressiva da supressão pelas células Treg Foxp3 $^+$ nas ilhotas liberando assim os “freios” e favorecendo a expansão patogênica das células Teff. A frequência encontrada de células Treg Foxp3 $^+$ no sangue de indivíduos com DM1 largamente não afetada (BRUSKO, T. M. *et al.*, 2005; LINDLEY *et al.*, 2005; BRUSKO, T. *et al.*, 2007; HASEDA *et al.*, 2013; RYBASTANISLAWOWSKA *et al.*, 2014). Contudo, células Treg Foxp3 $^+$ de indivíduos com DM1 exibem função supressora reduzida *in vitro* (D'ALISE *et al.*, 2008; SCHNEIDER, A. *et al.*, 2008). Esta atividade aberrante é correlacionada com variantes no gene *IL2RA* (CD25) e no gene *PTPN22* de risco para o DM1. A IL-2 é essencial para a homeostasia, expansão e função das células Treg Foxp3 $^+$ (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Ao contrário das células T convencionais, as células Treg Foxp3 $^+$ não produzem IL-2 devido a regulação negativa mediada por FoxP3 $^+$ da transcrição de IL2. Portanto, as células Treg Foxp3 $^+$ são dependentes de células T e DC como fontes de IL-2 (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Acredita-se que esta dependência seja importante para permitir que células Treg Foxp3 $^+$ percebam prontamente e respondam à inflamação. PTPN22 é uma fosfatase envolvida na sinalização através do IL-2R (HULME *et al.*, 2012). Notavelmente, as células Treg Foxp3 $^+$ que expressam estas variantes genéticas exibem sinalização reduzida através do IL-2R, que por sua vez, correlaciona-se com atividade supressora limitada (GARG *et al.*, 2012; HULME *et al.*, 2012). Defeitos na sinalização via IL-2R levaram estudos clínicos a testar se baixas doses terapêuticas de IL-2 aumentaria o *pool* das células Treg Foxp3 $^+$ em indivíduos com DM1 (HULME *et al.*, 2012; HARTEMANN *et al.*, 2013). Esta abordagem foi eficaz na prevenção e ou reversão do diabetes em camundongos *NOD* pelo aumento do número e função das células Treg Foxp3 $^+$ nas ilhotas (GRINBERG-BLEYER *et al.*, 2010; HULME *et al.*, 2012). Uma questão chave não abordada foi a especificidade das células Treg Foxp3 $^+$ em indivíduos com DM1. Redução do desenvolvimento tímico das células Treg Foxp3 $^+$ específicas de células β , como discutido acima, seria esperado para limitar os efeitos “anti-diabetogênicos” do *pool* periférico das células Treg Foxp3 $^+$.

Descobertas recentes demonstraram que o ambiente pró-inflamatório das ilhotas promove o processamento de “neo-autoantígenos” (ROEP *et al.*, 2016). É importante ressaltar que esses neoautoantígenos só são encontrados na periferia nos tipos de clones de células T correspondentes que não foram deletados no timo e, que possivelmente expressam TCR de alta afinidade, e podem ser recrutados para a resposta inflamatória. Neo-autoantígenos são gerados via modificações pós-traducionais (*posttranslational modifications* - PTM), tais como desamidação pela transglutaminase tecidual (*tissue transglutaminase* - tTG) (ROEP *et al.*, 2016). A PTM pode ocorrer durante o processamento do antígeno pelas APCs ou diretamente nas células β (MCLAUGHLIN *et al.*, 2016). Desamidação dependente de tTG de um peptídeo C da pró-insulina por exemplo, é detectado tanto em DCs humanas e em ilhotas sob condições inflamatórias (MCLAUGHLIN *et al.*, 2016). Notavelmente, o peptídeo modificado resultante é reconhecido pelas células T CD4⁺ derivadas de indivíduos com DM1. A ligação ao MHC e as propriedades estimuladoras das células T do peptídeo podem também ser melhorados por desamidação (VAN LUMMEL *et al.*, 2014).

Neo-autoantígenos constituídos por peptídeos híbridos foram recentemente identificados. Em camundongos *NOD*, peptídeos híbridos de insulina são gerados através de ligação covalente (*crosslinking*) do peptídeo de proinsulina C com peptídeo derivados de produtos de clivagem que ocorrem naturalmente produzidos nos grânulos secretores nas células β (DELONG *et al.*, 2016). Além da inflamação em curso, a PTM ocorre por meio do estresse do retículo endoplasmático que pode ser induzido nas células β por meio de demandas fisiológicas normais associadas aos altos níveis de secreção de insulina (PHELPS *et al.*, 2016). Portanto, é possível que os neo-autoantígenos das células β além de amplificarem a inflamação, desempenhem um papel na iniciação da resposta diabetogênica. Neo-autoantígenos também são gerados à nível transcricional. Mutações na fase de leitura do mRNA da insulina gera um neo-autoantígeno que estimula células T CD8⁺ de indivíduos com DM1, causando lise de células β *in vitro* (KRACHT *et al.*, 2017). O *splicing* alternativo do RNA pode ser outro mecanismo que leva à expressão de neo-autoantígenos, particularmente porque ~ 30% dos genes das células β inflamadas sofrem *splicing* alternativo aberrante (EIZIRIK *et al.*, 2012). Em suma, os neo-autoantígenos das células β servem como alvos genuínos das células T CD4⁺ e CD8⁺ patogênicas. A variedade do peptidoma dos neo-

autoantígenos produzidos e apresentados, e as propriedades das células T específicas para os neo-autoantígenos, em termos de frequência, avides/afinidade, fenótipo dos subgrupos (por exemplo, patogênico *versus* regulatório) e contribuição global para a inflamação de ilhotas requerem investigação adicional.

E finalmente, estudos mostram que propriedades intrínsecas das células β também influenciam a inflamação das células β . Por exemplo, a CXCL10 é produzidas pelas células β , embora o papel desta quimiocina na doença seja controverso (YOSHIMATSU *et al.*, 2017). CXCL10 regula a migração das células Teff e Treg Foxp3⁺ que expressam CXCR3 para as ilhotas (RHODE *et al.*, 2005; ROTONDI *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2009; SARKAR *et al.*, 2012). A superexpressão de CXCL10 nas células β acelera a progressão do DM1 e o bloqueio da CXCL10 por anticorpo impede a migração das células Teff para as ilhotas de camundongos *NOD* (RHODE *et al.*, 2005; ROTONDI *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 2009; SARKAR *et al.*, 2012). Por outro lado, a deficiência de CXCR3 acelera o DM1 através da redução das células Treg Foxp3⁺ residentes de ilhotas (HOMANN, 2015; TAN; MATHIS; BENOIST, 2016) (162, 163). Portanto, dependendo do contexto, as células β podem afetar os eventos inflamatórios e imunorregulatórios por meio da produção da CXCL10. A quimiocina CCL2 também é secretada pelas células β e a superexpressão ectópica de CCL2 recruta DCs que expressam CCR2 tolerogênicas e bloqueiam a progressão do DM1 em camundongos *NOD* (KRIEGEL; RATHINAM; FLAVELL, 2012). Curiosamente, APCs de camundongos *NOD* mostram migração defeituosa em resposta à CCL2, e pacientes com DM1 possuem concentrações séricas reduzidas de CCL2 (BOUMA *et al.*, 2005; GUAN *et al.*, 2011; KRIEGEL; RATHINAM; FLAVELL, 2012). Além disso, as células β produzem CXCL1 e CXCL2 que recrutam neutrófilos que expressam CXCR2 nas ilhotas, que contribuem para o estímulo da reatividade das células T células β específicas (DIANA; LEHUEN, 2014; CITRO; CANTARELLI; PIEMONTI, 2015). Em geral, os sinais quimiotáticos produzidos pelas células β regulam a progressão da resposta diabetogênica.

Juntamente com quimiocinas, as células β secretam a citocina IL-1 β , que em baixas concentrações promove a proliferação de células β e aumenta a produção de CCL2, CXCL1, CXCL2 e insulina (MAEDLER *et al.*, 2002; CARDOZO *et al.*, 2003). No entanto, a IL-1 β também estimula a inflamação mediada pelos efetores leucocitários, e a IL-1 β no contexto do TNF α , e/ou IFN- γ induz apoptose das

células β *in vitro* (CNOP *et al.*, 2005; YOON; JUN, 2005). Notavelmente, as células α secretoras de glucagon também produzem IL-1 β indicando que outras células endócrinas residentes nas ilhotas também podem contribuir para a inflamação local (CARDOZO *et al.*, 2003; ANQUETIL *et al.*, 2017). A inflamação das ilhotas também induz a regulação positiva do MHC de classe I e II nas células β para aumentar ainda mais a imunogenicidade das células β (THOMAS *et al.*, 1998). Curiosamente, uma subpopulação de células β foi identificada, que sob condições inflamatórias adquire resistência à destruição imunomediada em camundongos *NOD* (RUI *et al.*, 2017). Esta última está associada a um fenótipo de célula β mais imatura acoplado com expressão reduzida de auto-antígenos e regulação positiva de moléculas imunomoduladoras, como PD-L1, um indutor de exaustão de células T. Um fenótipo similar é observado para as células β humanas (RUI *et al.*, 2017). Portanto, as células β não apenas contribuem para a inflamação das ilhotas mas se adaptam sob as condições inflamatórias a fim de persistir. Uma melhor compreensão dos eventos que regulam essa dicotomia tem implicações importantes para o tratamento de pacientes com DM1 através de estratégias de substituição de células β , por exemplo.

2.3. SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DO DM1

A suscetibilidade ao DM1 é influenciada por fatores genéticos e a importância dos determinantes de risco hereditários é demonstrada pelo agrupamento da doença nas famílias. O risco de diabetes entre parentes de primeiro grau de indivíduos diabéticos é de 5 a 6%. Além disso, a taxa de concordância para a doença é muito maior entre os gêmeos monozigóticos do que para os gêmeos dizigóticos. Embora esta observação seja indicativa de uma grande contribuição genética para o risco de doença, a taxa de concordância relativamente baixa entre gêmeos idênticos sugere que os genes de susceptibilidade têm baixa penetrância; ou seja, nem todos os indivíduos geneticamente “em risco” de DM1 desenvolverão a doença (KELLY *et al.*, 2003).

A predisposição genética para DM1 é amplamente determinada pelos genes do antígeno leucocitário humano (HLA); no entanto, mais de 50 outras regiões genéticas conferem suscetibilidade. Um indivíduo portador de genótipo HLA de elevada predisposição para o DM1 contabiliza um risco absoluto de apenas

5% para desenvolver a doença até os 15 anos de idade. Esse risco quadruplica na presença de história familiar de DM1, sugerindo o efeito aditivo de outros genes (FROHNER *et al.*, 2016).

Os três principais *loci* não-HLA estabelecidos no DM1 são: o número variável de frequências repetidas (VNTR) do gene da insulina, o gene do antígeno 4 do linfócito T citotóxico (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 – CTLA-4*) e o gene da tirosina fosfatase não-receptora 22 (*protein tyrosine phosphatase nonreceptor-type 22 - PTPN22*) (SILVA, M. E.; MORY; DAVINI, 2008).

Como um elemento importante da genética, o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) tem sido alvo de muitas doenças autoimunes, e inclui sequências de codificação de genes, regiões de genes não codificantes e regiões intergênicas. Ao alterar a expressão de determinadas proteínas um polimorfismo pode influenciar o desenvolvimento de doenças (BEHRENS, 2011; FOUSTERI; LIOSSIS; BATTAGLIA, 2013).

Sendo o DM1 um distúrbio autoimune causado pela destruição mediada por linfócitos T às células β pancreáticas (“insulite”), uma vez estabelecida a insulite esta pode ser detectada indiretamente na triagem do soro para autoanticorpos de antígenos de ilhotas. Mas a especificidade deste ataque autoimune também pode ser atribuída a polimorfismos em alelos específicos do complexo de histocompatibilidade (MHC) humano de classe II. Essa alteração genética é descrita também em genes não-MHC; que estão associados com um amplo espectro de defeitos na tolerância imunológica em indivíduos com DM1 (GOTTUMUKKALA *et al.*, 2012).

No desenvolvimento clássico do DM1 na juventude, acredita-se que os fatores de risco genéticos contribuem para os diferentes estágios do desenvolvimento da doença. As variantes genéticas associadas ao diagnóstico de DM1 podem diferir (em parte ou inteiramente) das variantes associadas à positividade de autoanticorpos. Além disso, variantes genéticas diferentes ou sobrepostas podem acelerar o declínio da função das células β (ROBERTSON; RICH, 2018).

Além disso, outro fator que pode contribuir para a variação das taxas de incidência do DM1 é a diferença étnica de genes a qual poderia refletir importância no desenvolvimento do DM1 (JI *et al.*, 2010).

2.3.1. ANTÍGENO 4 ASSOCIADO AO LINFÓCITO T CITOTÓXICO (CTLA-4)

O antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) é um regulador negativo da ativação de células T que desempenha um papel importante na tolerância periférica e na prevenção de doença autoimune por inibição da ativação das células T (TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006; WALKER; SANSOM, 2011).

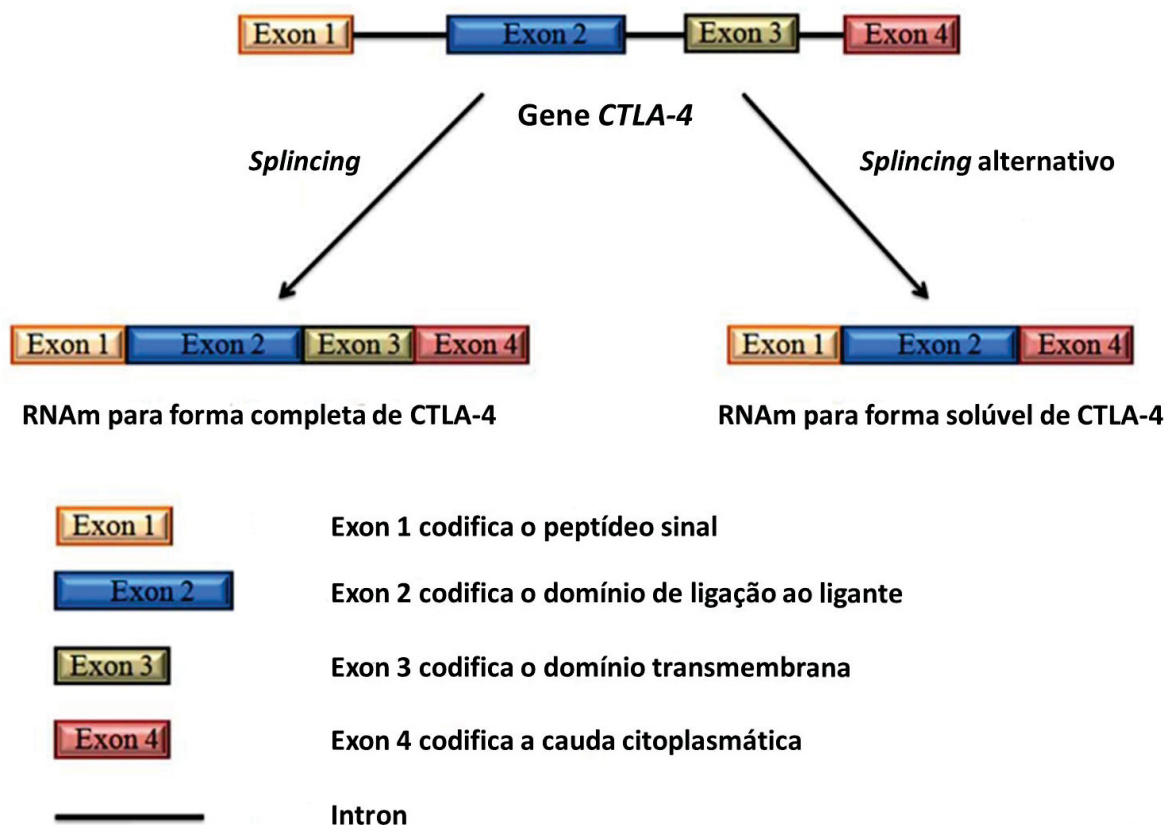
O gene *CTLA-4*, também conhecido como *CD152*, é composto por três íntrons e quatro éxons os quais codificam uma glicoproteína transmembrana com 223 aminoácidos (BRUNET *et al.*, 1987; DARIAVACH *et al.*, 1988). Os domínios são divididos em: éxon 1 que codifica o peptídeo sinal, éxon 2 que codifica o domínio extracelular, éxon 3 que codifica o domínio transmembrana e éxon 4 que codifica o domínio intracelular (BRUNET *et al.*, 1987; LING *et al.*, 1999) (Figura 3). A região extracelular é caracterizada por um único domínio (éxon 2) similar às imunoglobulinas (Igs) e contém um motivo MYPPPY, que é crítico para a ligação aos receptores CD80 e CD86, além de um sítio de dimerização (SCHWARTZ *et al.*, 2001; VIJAYAKRISHNAN *et al.*, 2004; TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006). O motivo MYPPPY está localizado na cauda citoplasmática de 36 aminoácidos desprovida de atividade enzimática intrínseca, mas que se mostrou essencial para a transendocitose e para a cascata de ciclagem de CTLA-4 (LO *et al.*, 2015; WALKER; SANSOM, 2015).

CTLA-4 é uma proteína altamente endocítica, permanecendo em sua maior parte dentro de vesículas intracelulares de transporte. Semelhante a CD28, CTLA-4 forma homodímeros (SCHWARTZ *et al.*, 2001) e não sofre alterações conformacionais depois de ligada nos seus ligantes (DARLINGTON *et al.*, 2005).

A proteína CTLA-4 existe em duas isoformas, a solúvel (sCTLA-4) e de comprimento total (fICTLA-4) (Figura 3). A forma solúvel de CTLA-4 (sCTLA-4) é gerada por splincing alternativo do RNAm. O RNAm que codifica sCTLA-4 consiste em 3 éxons: éxon 1 codifica um peptídeo sinal, éxon 2 domínio de ligação ao ligante e éxon 4 que é a cauda citoplasmática, mas ele não possui o éxon 3 responsável por codificar o domínio transmembrana (OAKS; HALLETT, 2000; OAKS *et al.*, 2000; HUURMAN *et al.*, 2007). O transcrito processado produz uma forma solúvel de CTLA-4 com 23 kDa. Esta forma protéica de CTLA-4 tem uma cauda citoplasmática única, que é característica de sCTLA-4, composta por 22

aminoácidos, portanto, 12 aminoácidos mais curta que a forma completa de fCTLA-4. sCTLA-4 não possui o resíduo de cisteína na posição 120 e é expressa como um monômero (OAKS; HALLETT, 2000; OAKS *et al.*, 2000; HUURMAN *et al.*, 2007).

FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA CTLA-4.



Geração do RNAm completo de CTLA-4 e sCTLA-4. O transcrito completo de CTLA-4 consiste em 4 éxons: éxon 1, 2, 3 e 4, enquanto que o transcrito de sCTLA-4 consiste em apenas 3 éxons: éxon 1, 2 e 4 gerados por RNAm alternativamente processado. O resultado do *splicing* alternativo é a deleção de 110 pb correspondente a todo o domínio transmembrana da molécula CTLA-4 e à mutação dentro do domínio citoplasmático de sCTLA-4.

Fonte: Adaptado de SIMONE, SEVERINO (2009).

CTLA-4 é um gene que pode ser expresso por células T CD4⁺ e CD8⁺ (HEGEL *et al.*, 2009). Mas não é expresso na superfície de células T efetoras em repouso, sendo constitutivamente, expresso pelas células Treg (TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006; WALKER; SANSOM, 2011). O RNAm de CTLA-4 em células T é detectado dentro de 1 hora após o acionamento do receptor de células T (TCR) por células APCs, com incidência de picos em torno de 24-36 horas após a

estimulação por autoantígenos- APCs (TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006). Já a expressão protéica de CTLA-4 na superfície celular das células T é detectável 24-48 horas após a ativação dessas células (WALUNAS *et al.*, 1994; TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006). A expressão de CTLA-4 nas células B humanas tem sido discutida de forma controversa, uma vez que, Kuehn e colaboradores (2014) detectaram CTLA-4 na superfície das células B CD19⁺ ativadas após estimulação com anticorpo anti-CD3 e anti-CD28. Outros estudos não detectaram nenhuma molécula de CTLA-4 na superfície de quaisquer células B CD19⁺. (SCHUBERT *et al.*, 2014). No entanto, expressão transiente de CTLA-4 em células B induzida por ativação dependente de células T foram relatadas em um estudo murino (QUANDT *et al.*, 2007).

Os produtos transcritos de sCTLA-4 foram detectados nos gânglios linfáticos, baço, subgrupos CD4⁺ e CD8⁺ de células T, linfócitos B (OAKS *et al.*, 2000), e em monócitos (LIU, M. F. *et al.*, 2003). Esta forma protéica não foi detectada em tecidos não linfóides como a adrenal, cérebro, olhos, coração, rim, fígado, pulmão, ovário, pâncreas, glândula salivar, vesículas seminais, músculo esquelético, testículos e tireóide (OAKS *et al.*, 2000). Uma análise de distribuição dos transcritos da forma solúvel e completa de CTLA-4 entre os subconjuntos de células T CD4⁺ e CD8⁺ demonstrou que as células CD4⁺ expressam ambos os transcritos em mesmo nível, enquanto as células CD8⁺ parecem expressar aproximadamente 2,5 vezes mais transcrito CTLA-4 completo do que o sCTLA-4 (OAKS; HALLETT, 2000; OAKS *et al.*, 2000; HUURMAN *et al.*, 2007). Baixas concentrações séricas de sCTLA-4 foram detectadas em soro humano normal (BRUNET *et al.*, 1987; DARIAVACH *et al.*, 1988; LAFAGE-POCHITALOFF *et al.*, 1990; OAKS; HALLETT, 2000; OAKS *et al.*, 2000; WANG, X. B.; GISCOMBE, R.; *et al.*, 2002; LIU, M. F. *et al.*, 2003; BERGHOLDT *et al.*, 2005; HUURMAN *et al.*, 2007; SAVERINO *et al.*, 2007).

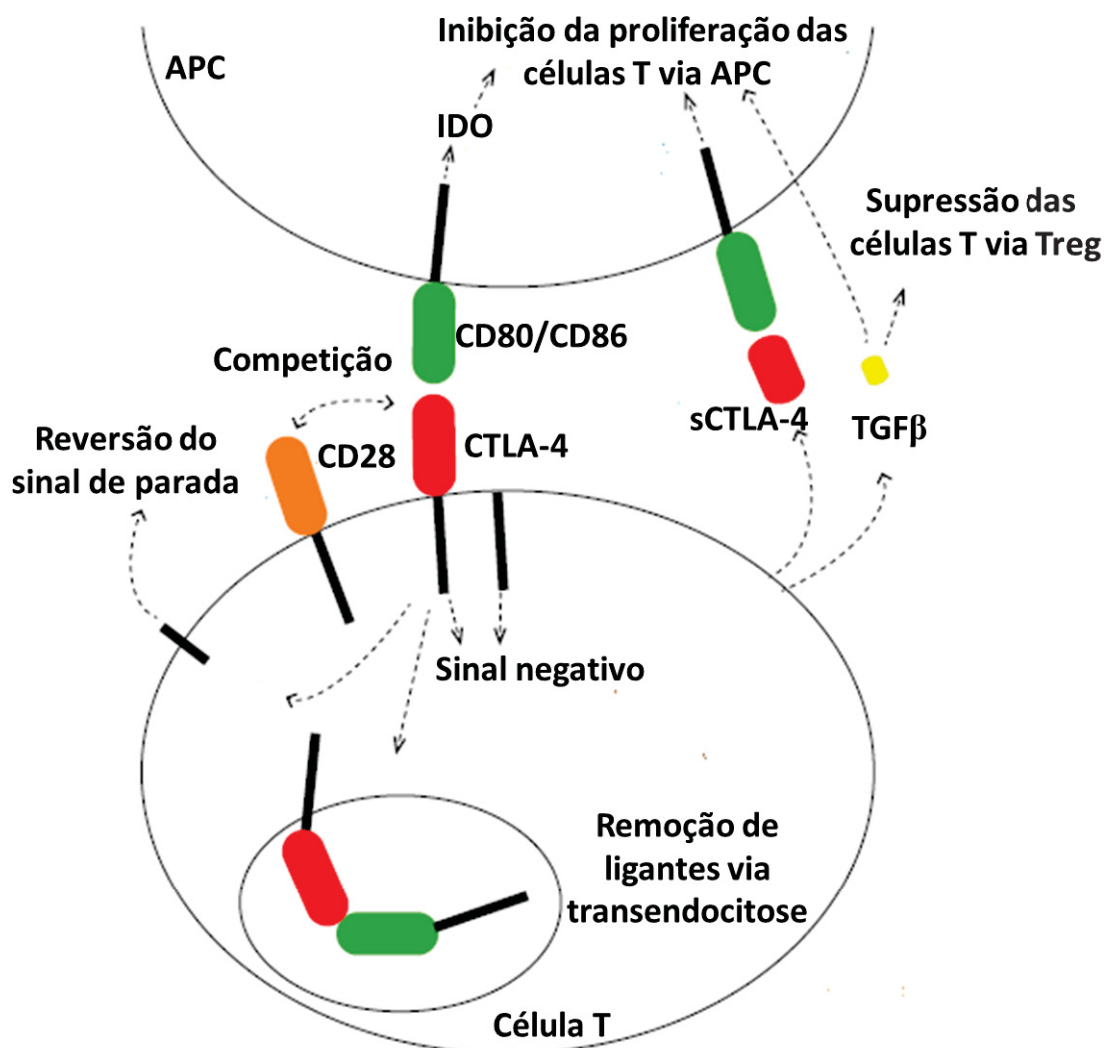
Após a interação do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) com o receptor TCR, a ativação eficiente das células T requer sinais co-estimulatórios positivos de CD28 (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001; GAUD; LESOURNE; LOVE, 2018). Enquanto CD28 é constitutivamente expresso nas células T, a proteína CTLA-4 localiza-se primariamente no compartimento intracelular (LINSLEY *et al.*, 1996; SANSOM, 2015). CD28 liga-se ao receptor CD80 (também conhecido como B7-1) e ao receptor CD86 (também conhecido

como B7-2), que são expressos na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs) (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001). Como resultado da sinalização de CD28, ocorre produção de citocinas, incluindo aumento da IL-2 nas células T, e a sobrevivência das células T é promovida pela indução da molécula anti-apoptótica linfoma de células B-XI (*B cell-lymphoma XL– BCL-XL*) (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001; SHARPE; FREEMAN, 2002). Após a ligação de CD28 e ativação de células T o número de receptores TCRs é regulado negativamente pela sua internalização e degradação (VALITUTTI *et al.*, 1997), e o limiar de ativação de células T é reduzido (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001). Isso é necessário para que as células T produzam citocinas e proliferem efetivamente (ALEGRE; FRAUWIRTH; THOMPSON, 2001; SHARPE; FREEMAN, 2002).

Como CD28, a proteína CTLA-4 forma homodímeros e liga-se às moléculas B7 do tipo CD80 e CD86 (WALKER; SANSOM, 2011). No entanto, CTLA-4 liga-se às moléculas B7 com maior avidéz e afinidade (SANSOM; WALKER, 2006; TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006; WALKER; SANSOM, 2011), portanto, competindo com CD28 pelos seus ligantes (THOMPSON; ALLISON, 1997). Dadas as diferenças na afinidade, um modelo para a função inibitória de CTLA-4 é a ligação preferencial de CTLA-4 à CD80 e CD86 excluindo CD28 e, portanto, interrompendo a sinalização de ativação de células T através de CD28 (WALKER; SANSOM, 2011). Está bem estabelecido que a função principal de CTLA-4 é inibir a ativação das células T e manter a homeostase imune (WALKER; SANSOM, 2011). Camundongos portadores de uma mutação heterozigótica de CTLA-4 pareciam normais, enquanto que os camundongos com uma mutação homozigótica tinham desordem linfoproliferativa letal (TIVOL *et al.*, 1995; WATERHOUSE *et al.*, 1995; WING *et al.*, 2008). O uso de anticorpos anti-CTLA-4 em camundongos mostraram que CTLA-4 teve efeitos opostos ao CD28, com redução da proliferação e ativação das células T (WALUNAS *et al.*, 1994; KRUMMEL; ALLISON, 1995; TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006).

Apesar de um número considerável de estudos sobre o papel do CTLA-4; modelos simples da função inibitória de CTLA-4 ainda não foram estabelecidos. Walker e colaboradores (2011) propuseram modelos de funcionamento de CTLA-4 considerando fatores celulares intrínsecos e extrínsecos (Figura 4).

FIGURA 4. MODELO FUNCIONAL DE CTLA-4.



As principais funções do CTLA-4 são divididas em fatores celulares intrínsecos e extrínsecos. No modelo intrínseco CTLA-4 entrega um sinal negativo para as células T que expressam CTLA-4 após sua ativação. Variantes de *splicing* alternativo de CTLA-4 podem transmitir um sinal inibitório. A competição com CD28 e a ligação aos receptores CD80 ou CD86 leva à inibição da ativação das células T. Estes ligantes são fisicamente removidos por transendocitose mediada por CTLA-4. CTLA-4 tem a habilidade de parada reversa do seu sinal, controlando a adesão e a motilidade entre as APCs e as células T. No modelo extrínseco, a proliferação de células T é inibida através da modulação das APCs pela ligação à CTLA-4 e à TGF- β . Células Treg estimuladas pelo TGF- β também suprimem a ativação das células T. APC: células apresentadoras de antígenos; Tregs: células T reguladoras; TGF- β : fator de transformação do crescimento β ; LFA1: antígeno associado à aunção leucocitária 1; IDO: indoleamina 2,3-dioxigenase.

Fonte: Adaptado de MITSUIKI, SCHWAB, GRIMBACHER (2019).

Os fatores intrínsecos consistem-se em quatro: (a) entrega de um sinal negativo (CHUANG *et al.*, 2000; SCHNEIDER *et al.*, 2002; CHIKUMA; IMBODEN; BLUESTONE, 2003; SCHNEIDER, H. *et al.*, 2008); (b) sinal inibitório ligante

independente baseados em estudos de uma variante de *splice* de CTLA-4 (VIJAYAKRISHNAN *et al.*, 2004); (c) inibição da sinalização de CD28 através da ligação à CD80 ou CD86 de forma competitiva (THOMPSON; ALLISON, 1997; COLLINS *et al.*, 2002); (d) controle de adesão e motilidade entre as células APCs e T (SCHNEIDER *et al.*, 2006).

O *CTLA-4* aumenta a mobilidade dos linfócitos T, limitando assim o tempo de contato deles com as células apresentadoras de antígenos insulínicos (APCs) (WALKER; SANSOM, 2015). Miska e colaboradores (2014) também relataram que *CTLA-4* transmite um sinal indutório para aumentar a mobilidade dos linfócitos auxiliares T CD8⁺, e com isto permitir a ligação de *CTLA-4* nas células APCs para reduzir a alta reatividade do linfócito T. Ao mesmo tempo, *CTLA-4* emite um sinal inibitório para os linfócitos auxiliares T CD4⁺, pois esta célula é responsável pela captação de moléculas de insulina e ligação com células beta pancreáticas que posteriormente serão destruídas (GAO; YANG; QI, 2015).

Os fatores extrínsecos são, também, compostos por quatro fatores: (a) ativação CTLA-4 mediada pela indoleamina 2,3-dioxigenase (*Indoleamina-2,3-dioxygenase* - IDO) (GROHMANN *et al.*, 2002; FALLARINO *et al.*, 2003; MUNN; SHARMA; MELLOR, 2004); (b) supressão das APCs ou células T e estimulação de células Treg através de citocinas reguladoras (CHEN; JIN; WAHL, 1998; NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001); (c) função inibitória das variantes solúveis de CTLA-4 (OAKS; HALLETT, 2000); (d) remoção física de CD80 e CD86 por transendocitose (QURESHI *et al.*, 2011). Um dos mecanismos de ação da proteína CTLA-4 para inibir a alta ativação de linfócitos T se dá por meio de envio de um sinal às células APCs, através dos ligantes CD80 e CD86, com a finalidade de produzir a enzima Indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO). Esta enzima leva a depleção do aminoácido triptofano; essencial para a proliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no meio periférico (MUNN; SHARMA; MELLOR, 2004) (Figura 4).

Rudd (2008) também sugere modelos mecânicos similares para a proteína CTLA-4 com fatores extrínsecos, como as células Treg, IDO e fator de transformação do crescimento β (*transforming growth factor- β* -TGF- β), competição com o CD28, regulação das vias de sinalização negativa, inibição dos *rafts* (microdomínios de membranas mais compactados) lipídicos e o formação do microcluster e sinal de parada reversa. Estes modelos poderiam explicar vários mecanismos inibitórios da CTLA-4, mas sua aparente contribuição para as

configurações específicas de uma resposta imune não é totalmente entendida (WALKER; SANSOM, 2011) (Figura 4).

A forma solúvel de CTLA-4 (sCTLA-4) foi descrita e demonstrou ser uma molécula funcional com capacidade de ligação à CD80 e à CD86 (OAKS; HALLETT, 2000; OAKS *et al.*, 2000; WANG, X. B.; GISCOMBE, R.; *et al.*, 2002; HUURMAN *et al.*, 2007; SAVERINO *et al.*, 2007; SIMONE, R. *et al.*, 2009).

De modo geral, a regulação negativa do sistema imunológico é exercida por *CTLA-4* já que este gene reduz o sinal dos receptores das células Infocitárias T (TCR) com os auto-antígenos pró-insulínicos. Por isso, o gene *CTLA-4* tornou-se clinicamente um biomarcador imunológico (WALKER; SANSOM, 2011; OLDE NORDKAMP; KOELEMAN; MEYAARD, 2014).

Sua expressão desregulada leva à muitas doenças autoimunes, como a artrite reumatóide (AR) (LUTEREK-PUSZYNSKA *et al.*, 2017), doença celíaca (DC) (HUNT *et al.*, 2005) e o *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) (DOUROUDIS *et al.*, 2009; TAVARES *et al.*, 2015).

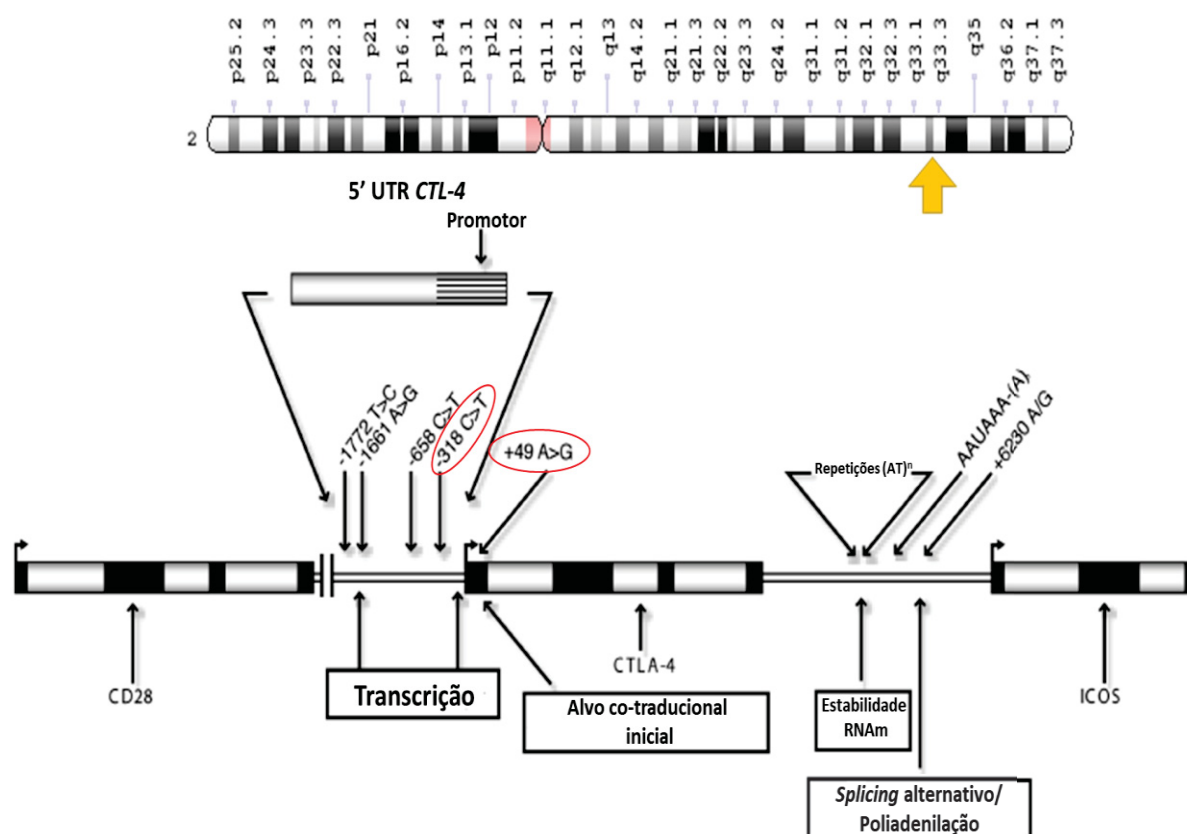
As células T autorreativas são normalmente excluídas durante a seleção linfóide e as que conseguem escapar são mantidas em controle no meio periférico por uma infinidade de mecanismos de tolerância, entre eles a ação inibitória de CTLA-4. Em pacientes com fatores de risco genéticos para o *Diabetes mellitus* tipo 1, os mecanismos de tolerância imunológica estão enfraquecidos ao ponto de uma pequena perturbação entre a ativação do sistema imune e a sua regulação desencadear a doença (SPENCE; TANG, 2016). Tivol e colaboradores (1995), assim como Gribben e colaboradores (1995) afirmaram que o rompimento do equilíbrio entre as interações CD28 e CTLA-4 com os ligantes B7 poderia levar ao estabelecimento da doença autoimune DM1, impedindo a apoptose ou a regulação negativa da auto-reação ativada dos linfócitos T.

O gene *CTLA-4* está localizado junto com os genes *CD28* e co-estimulador de células T indutíveis (*ICOS*) na banda q33 no braço longo do cromossomo 2 (DARIAVACH *et al.*, 1988; LING *et al.*, 1999; LING *et al.*, 2001; TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006) (Figura 5).

Existem estudos que demonstraram que polimorfismos na região do gene *CTLA-4* estão associados as características clínicas e as condições patológicas de DM1 (RANJOURI *et al.*, 2016). Diversos polimorfismos no gene *CTLA-4* já foram descritos, sendo o primeiro relato de associação com doenças autoimunes feito em

um estudo sobre a doença Graves em população caucasiana utilizando marcadores microssatélites no éxon 4 (YANAGAWA *et al.*, 1995). Posteriormente, um novo estudo encontrou associação entre um polimorfismo no éxon 1 (rs231775) com o *Diabetes mellitus* tipo 1 e também com a doença Graves (NISTICO *et al.*, 1996).

FIGURA 5. CROMOSSOMO 2 E A REGIÃO DE POSICIONAMENTO DO GENE *CTLA-4*.



Localização do gene *CTLA-4* no braço longo do cromossomo 2 (seta amarela). Os polimorfismos -318C/T (rs5742909) e +49A/G (rs231775) estão destacados com círculos vermelhos. *CTLA-4* e suas regiões flangeantes 5' e 3' localizam-se dentro de um bloco de desequilíbrio de ligação (LD) associado ao *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1). *CD28* e *ICOS*, dois outros genes candidatos importantes na função imunológica, localizam-se fora do bloco de haplótipos. Efeitos na região final 5' são evidentes, como um polimorfismo no promotor e uma substituição de aminoácidos na posição do peptídeo sinal.

Fonte: Adaptado de KIM, POLYCHRONAKOS (2005).

O polimorfismo +49A/G (rs231775) encontrado na posição 49 do éxon 1 do gene *CTLA-4* gera a transição da base nucleotídica adenosina por guanina, resultando na troca do aminoácido na posição 17 do códon do peptídeo sinal, onde a treonina é trocada por alanina (T17A). Ueda e colaboradores (2003) sequenciaram uma região de mais de 300 Kb contendo o *CD28*, *CTLA-4* e *ICOS* e

entre os 108 polimorfismos identificados, apenas o SNP rs231775 mostrava alteração de aminoácido. Nessa mesma região encontraram-se vários polimorfismos em desequilíbrio de ligação com o +49A/G (MARRON *et al.*, 1997) (Figura 5).

No polimorfismo rs231775 o alelo G (Ala17) de predisposição ao risco de DM1 é glicosilado de forma incompleta no retículo endoplasmático levando ao transporte retrógrado de uma porção das moléculas no citoplasma para a degradação. Isto acaba resultando em menos CTLA-4 na superfície celular, o que poderia explicar a função inibitória reduzida de CTLA-4 relatada em pacientes com alelo de risco +49G (ANJOS, S. *et al.*, 2002; MAURER *et al.*, 2002).

Este SNP tem sido amplamente estudado em doenças autoimunes, e tem sido reportado a associação do alelo G com doença de Graves (DG) (LOMBARDI *et al.*, 2016), lúpus eritematoso sistêmico (LES) (DEVARAJU *et al.*, 2014), hipotireoidismo autoimune (NITHIYANANTHAN *et al.*, 2002), pênfigo foliáceo (DALLA-COSTA *et al.*, 2010), esclerose sistêmica (SONG; LEE, 2013) e *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) (KHODAEIAN *et al.*, 2015).

Nistico e colaboradores (1996) encontraram uma forte associação entre o risco de DM1 e o polimorfismo +49A/G do *CTLA-4*, fator não confirmado por Yanagawa e colaboradores em 1999. O genótipo de menor frequência (GG) foi associado com DM1 na população Chinesa (JIN *et al.*, 2009), e em descendentes caucasoides incluindo a população Libanesa (ZALLOUA *et al.*, 2004), Holandesa (ZHERNAKOVA *et al.*, 2005), Norte-europeia (DOUROUDIS *et al.*, 2009), e população branca Norte-Americana (CONCANNON *et al.*, 2009). No entanto, esta associação não foi verificada em população não caucasóide, como a Chilena (BALIC *et al.*, 2009), Norte-Indiana (BANIASADI *et al.*, 2006), Coreana (JUNG *et al.*, 2009), Japonesa (IKEGAMI *et al.*, 2006) e Portuguesa (LEMOS *et al.*, 2009). Existem evidências de que os linfócitos T após estímulo *in vitro* de indivíduos homocigotos para o alelo predisponente de diabetes G (17Ala) apresentaram aumento da proliferação e da produção de citocinas quando comparados com as células de homocigotos para o alelo protetor A (17Thr) (KOUKI *et al.*, 2000; MAURER *et al.*, 2002).

Análise da associação entre o nível de RNAm de sCTLA-4 e o polimorfismo +49A/G no gene *CTLA-4* em indivíduos saudáveis mostraram que os níveis do RNAm de sCTLA-4 em células T CD4⁺ não estimuladas foi maior para o alelo A na

posição +49 desta variante (YANAGAWA *et al.*, 1995). Ainda é difícil explicar porque nas doenças autoimunes o genótipo de suscetibilidade (+49G/G) está associado aos níveis mais baixos de transcritos de sCTLA-4 (YANAGAWA *et al.*, 1995; LIGERS *et al.*, 1999; OAKS; HALLETT, 2000; OAKS *et al.*, 2000; GIORELLI *et al.*, 2001; ANDREEVSKII *et al.*, 2002; OROZCO *et al.*, 2004; VAIDYA; PEARCE, 2004; BERGHOLDT *et al.*, 2005; PUROHIT *et al.*, 2005; BROPHY *et al.*, 2006; SAVERINO *et al.*, 2007). Os mecanismos exatos desse fenômeno ainda são desconhecidos. Pode-se supor que a tradução de ambos os transcritos de CTLA-4 (sCTLA-4 e CTLA-4 completo) e/ou tráfico intracelular e liberação de sCTLA-4 possa estar ocorrendo de forma anormal nesses pacientes (SIMONE, RITA; SAVERINO, 2009).

Deichmann e colaboradores (1996) identificaram uma variante polimórfica -318C/T ou rs5742909, responsável pela transição alélica de citosina por timina na posição -318 da região promotora do gene *CTLA-4*. A atividade do promotor se tornou mais alta com a variante T (-318). A alta expressão gênica pode, portanto, explicar a associação do alelo T (-318) com menor risco de uma variedade de doenças autoimunes (LIGERS *et al.*, 2001; WANG, X. B.; ZHAO, X.; *et al.*, 2002; ANJOS, S. M.; TESSIER; POLYCHRONAKOS, 2004). A alta expressão gênica pode, portanto, explicar a associação do alelo T (-318) com menor risco de uma variedade de doenças auto-imunes. No entanto, a associação o polimorfismo -318C/T na região promotora com auto-imunidade demonstra-se fraca e inconsistente, em contraste com outros polimorfismos do gene *CTLA-4* (HEWARD *et al.*, 1998; LIGERS *et al.*, 2001; WANG, X.-B. *et al.*, 2002; HUBER *et al.*, 2008).

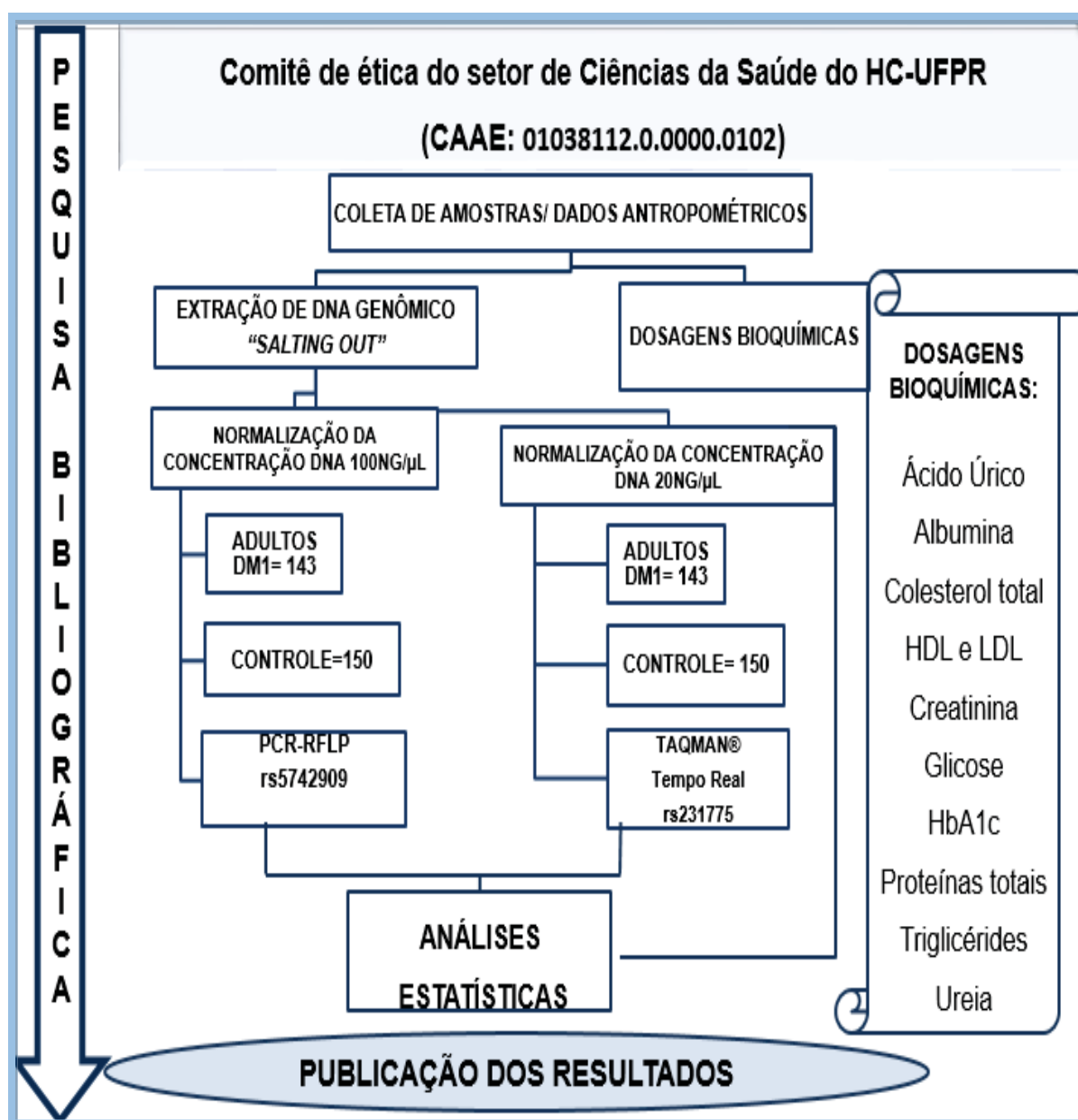
Um número limitado de estudos investigaram a associação da variante -318C/T no gene *CTLA-4* com DM1, mas não foi encontrada associação com o DM1 (BANIASADI *et al.*, 2006; CAPUTO *et al.*, 2007; ANGEL *et al.*, 2009; BALIC *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2009; ALMASI *et al.*, 2015).

Além disso, uma meta-análise de 5.637 pacientes e 6.759 controles não demonstraram associação entre a variante -318C/T com o DM1 (OR=0,92; 95% CI 0,45-1,89) após vários fatores de confusão serem controlados (KAVVOURA; IOANNIDIS, 2005). Enquanto que a variante -318C/T foi conectada à desordens com imunidade alterada (ALMASI *et al.*, 2006; BALBI *et al.*, 2007), sua contribuição, se houver alguma, ao DM1 permanece questionável.

3. METODOLOGIA

Projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná sob o CAAE: 01038112.0.0000.0102, com número de parecer 7186 na Plataforma Brasil (Anexo1). Abaixo (Figura 6) as principais etapas da pesquisa.

FIGURA 6. FLUXOGRAMA DO PROJETO.



DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; PCR-RFLP: reação em cadeia da polimerase – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (*restriction fragment length polymorphism*); n = número de indivíduos.

Fonte: O autor (2018).

3.1. AMOSTRAS

O presente estudo caracterizado como do tipo caso-controle foi realizado em uma amostragem da população Sul Brasileira (n=288) subdividida em dois grupos. O grupo DM1 foi constituído de pacientes que tiveram o diagnóstico de diabetes antes dos 18 anos de idade (n=143) e o grupo de controle, constituído de adultos não diabéticos (n=145). Os indivíduos saudáveis foram selecionados no Banco de sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná/UFPR (controle) e os pacientes diabéticos no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR - SEMPR (diabéticos), sendo a participação de livre aceitação através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

Os dados antropométricos e clínicos foram obtidos por meio de entrevista (Anexo 3) (grupo controle e diabéticos) e prontuário (diabéticos). Os grupos em estudo foram pareados por sexo.

As amostras de sangue total e soro dos pacientes foram coletadas durante os exames de rotina no Hospital de Clínicas da UFPR. Foi coletado aproximadamente 4 mL de sangue em tubos secos com gel separador para obtenção do soro; e 4 mL em tubos contendo 7,2 mg do anticoagulante K₂EDTA (BD Vacutiner) para obtenção do plasma e extração de DNA leucocitário.

Alíquotas de soro (~1,5 mL) foram congeladas em freezer a -20°C e -80°C até a realização das dosagens bioquímicas. Amostras hemolisadas, lipêmicas ou ictéricas foram excluídas dos ensaios. O *buffy coat* foi separado, e mantido em freezer a -20°C para posterior extração de DNA.

3.2. EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA genômico foi extraído a partir da alíquota de *buffy coat*, por meio do método de *Salting out* (LAHIRI; NURNBERGER, 1991). A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260 e 280 nm (NanoDrop; Thermo Scientific), sendo o critério de exclusão amostras com concentração inferior a 20 ng/μL e grau de pureza menor que 1,5 ou superior a 2,1, em relação a razão $A_{260/280}$, o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra.

A qualidade do DNA também foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5 a 2,0%) com identificação dos fragmentos corados em brometo de etídeo, com imagem detectada em em câmera de transiluminação CCD em sistema L-Pix (Loccus Biotecnologia).

Todas as amostras foram diluídas em concentração de 100 ng/μL utilizando água ultrapura estéril; com posterior armazenamento em freezer a -20°C.

Para análises de genotipagem através do sistema TaqMan®, as amostras utilizadas possuíam concentração final de 20 ng/μL, diluição feita com água ultrapura estéril e armazenagem em freezer a -20°C.

3.3. POLIMORFISMOS ALVOS DO ESTUDO

O quadro 1 apresenta os polimorfismos estudados neste trabalho e o respectivo gene.

QUADRO 1. CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.

Gene	Designação OMIN®	Cromossomo Posição	Localização Região	SNP	Substituição alélica
CTLA-4	123890.0001	2q33.2	Éxon 1	rs231775, + 49 AG ou THR17AL A T17A	A> G
CTLA-4	—	2q33.2	Promotora	rs5742909, -318 CT ou -319 CT	C> T

rs: reference SNP; OMIN®: Online Mendelian Inheritance in Man®; CTLA-4: Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico - *cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*.

Fonte: Adaptado de (NCBI, 2018; OMIM, 2018)

3.4. REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (TAQMAN®)

A genotipagem do polimorfismo rs231775 (C_2415786_20) do gene *CTLA-4* foi realizada no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) com sondas

fluorescentes específicas (*TaqMan® SNP genotype assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos*). A reação foi realizada conforme preconizado pelo fabricante do reagente em equipamento de PCR em tempo real 7500Fast™ (*Applied Biosystems*).

O sistema com sondas TaqMan® utiliza dois oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos (forward e reverse) que flanqueiam as sondas que participam da amplificação da região polimórfica alvo do estudo. Cada sonda é construída contendo um corante repórter fluorescente em sua extremidade 5' (VIC® e FAM™, respectivamente para as sondas dos alelos 1 e 2, azul e vermelho) e um corante silenciador (quencher) em sua extremidade 3'.

Quando os primers iniciadores da reação de amplificação se anelarem na região específica da fita de DNA molde; a enzima DNA polimerase iniciará a replicação do DNA e quando encontrar a sonda anelada utilizando sua atividade de éxonuclease (5'>3') cliva a sonda, a liberando do corante silenciador. Desse modo ocorrerá emissão de fluorescência durante a amplificação do DNA. Cada alelo é pareado com um fluoróforo distinto, VIC® ou FAM™, sendo que o padrão de fluorescência identifica o genótipo (Anexo 4).

Em cabine de fluxo laminar, a fim de evitar contaminação, os ensaios TaqMan® foram realizados em placas de 96 poços. Em cada placa foi adicionado dois controles negativos (NTC: *negative template control*), os quais continham apenas a mistura de reação de PCR *Super Master Mix®* e água ultrapura estéril (sem amostra de DNA). Os grupos de pacientes diabéticos e controles saudáveis foram ensaiados de forma aleatória, na mesma placa.

Todas as genotipagens consideradas neste trabalho apresentaram qualidade superior a 98% identificada pelo software do sistema *7500 fast da Applied Biosystems* excluindo, portanto, a necessidade de investigação de fontes de baixa eficiência na PCR e/ou repetição das análises.

No quadro 2 estão descritas em protocolo as condições para ensaio de genotipagem utilizando o sistema de PCR tempo real.

QUADRO 2. PROTOCOLO PARA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS FLUORESCENTES.

REAGENTES	VOLUME FINAL PARA REAÇÃO DE 8 µL	
SNP genotyping assay (40x) TaqMan®	0,1 µL	
Super Master Mix® (2x)	3,0 µL	
Água regente ultrapura estéril	1,9 µL	
DNA molde (20 ng/µL)	3,0 µL	
CICLOS TÉRMICOS:	1 ciclo	60°C por 30 seg.
	1 ciclo	95°C por 10 minutos
	50 ciclos	95°C por 15 seg. 60°C por 90 seg.
	1 ciclo	60°C por 30 seg.

Sonda TaqMan® SNP Genotyping Assays – Life Technologies, contendo um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers), marcados com fluoróforos distintos (VIC e FAM). Master Mix: reagente comercial contendo DNA polimerase AmpliTaq Gold® ultrapura, desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), referência passiva ROX e tampão. Fonte: O autor (2018).

3.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PCR - RFLP

A identificação da variante genética -318C>T (rs5742909) no gene *CTLA-4* foi realizada através da técnica de PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) no Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR. Um amplicon de 247 pares de base (pb) foi gerado utilizando oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen™) descritos por Shojaa e colaboradores (2014): Forward 5'-AAATGAATTGGACTGGATGGT-3' e Reverse 5'-TTACGAGAAAGGAAGCCGTG-3'. As condições de PCR utilizadas para as ampliações estão descritas abaixo no Quadro 3.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador Biocycler (*Biosystems*). Uma alíquota de 2,0 µL de produto de PCR, juntamente com 3,0 µL de solução tampão de aplicação (glicerol 30%; azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%) foi então aplicada nos poços de gel de agarose a 2,0 %.

A mistura foi submetida à eletroforese submarina com voltagem constante de 90 Volts (~24 mA), em temperatura ambiente durante por cerca de 1,45 horas, em tampão TBE 1X (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1,0 mmol/L, pH 8,2).

QUADRO 3. CONDIÇÕES PARA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NA REGIÃO POLIMÓRFICA DO GENE *CTLA-4*.

REAGENTES	rs5742909 DO GENE <i>CTLA-4</i>	
Oligonucleotídeos iniciadores (PRIMERS)	F 5'-AAATGAATTGGACTGGATGGT-3' R 5'-TTACGAGAAAGGAAGCCGTG-3'	
	Concentração final	Volumes (reação 20 µL)
Água Regente Ultrapura estéril	—	12,6 µL
Tampão Taq 10x *	1x	2,0 µL
Primer forward (10 pmol/µL)	0,5 pmol	1,0 µL
Primer reverse (10 pmol/µL)	0,5 pmol	1,0 µL
MgSO ₄ (50 mM) **	1,5 mM	1,2 µL
dNTP (5 mM)	0,2 mM	0,8 µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0,1 U	0,4 µL
DNA molde (100 ng/µL)	100 ng/µL	1,0 µL
CICLOS TÉRMICOS	CICLOS	TEMPERATURA/TEMPO
	1 ciclo	94°C por 2 minutos
	30 ciclos	94° C por 30 segundos
		60°C por 30 segundos
1 ciclo	72°C por 30 segundos	
	1 ciclo	72°C por 7 minutos

*Tampão TAQ 10X, (NH₄)₂SO₄ 750 mM, Tris-HCl (pH 8,8; 25°C); 0,1% (v/v) Tween 20. Taq DNA platinum polymerase (Invitrogen™). ** MgSO₄ (50 mM) da Fermentas®

Fonte: O autor (2018).

O produto amplificado de PCR foi corado, posteriormente, com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado em transiluminador sob luz UV (302 nm). A imagen do gel foi capturada no sistema L-Pix (Loccus Biotecnologia). Após a amplificação, o produto de PCR foi digerido utilizando a enzima de restrição *Mse I* (New England BioLabs, Hitchin, UK) (Figura 7) e o protocolo para a reação de restrição está descrito no Quadro 4.

FIGURA 7. SÍTIO DE RESTRIÇÃO DA ENZIMA ENDONUCLEASE *MSE I*.



A seta em vermelho indica o sítio de clivagem da endonuclease *MSE I*.

Fonte: O autor, 2018.

QUADRO 4. PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DO POLIMORFISMO rs5742909 NO GENE *CTLA-4*.

REAGENTES	VOLUMES	CONCENTRAÇÃO FINAL
Produto de PCR (~20 ng/μL)	1,0 μL	~4 ng
Tampão/ Buffer 10x *	0,50 μL	1X
Água regente ultrapura estéril	3,35 μL	-
Enzima de Restrição <i>MseI</i> (10 U/μL)	0,10 μL	1U
BSA acetilada 10X	0,05 μL	1X
Volume final da reação	5,0 μL	-
Temperatura de Incubação	37,0°C	-
Tempo de incubação	3 horas	-

Tampão TAQ 10X New England BioLabs®, Buffer C, 100 mM, Tris-HCl (pH 7,9; 37°C); 500 mM NaCl; 100 mM MgCl₂; 10 mM Dithioerythritol. BSA: albumina sérica bovina acetilada 0,1mg/mL. Enzima *MseI* (New England BioLabs®).

Fonte: O autor (2018).

Os fragmentos de DNA oriundos dessas reações de PCR-RFLP foram separados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 29:1 a 15%, utilizando uma cuba mini Protean 3 BioRad (100x75x0,75 mm). Ao volume da reação de restrição foi acrescido 4,0 μL de solução de aplicação (glicerol 30% v/v, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol). Em seguida, essa mistura foi aplicada em gel de poliacrilamida e visualizada com transiluminador CCD sob luz UV (302 nm) e fotodocumentado com sistema L-PIX (Loccus Biotecnologia).

3.6. DOSAGENS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DADOS ANTROPOMÉTRICOS

As dosagens bioquímicas incluíram marcadores de função renal (ureia, creatinina e ácido úrico), perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C, nHDL, triglicerídeos, Log TG/ HDL), controle glicêmico (glicemia em jejum, perfil glicêmico, hemoglobina glicada – HbA1C, 1,5-Anidroglicitol), marcadores de função hepática (GGT, AST, ALT), assim como marcadores de estado nutricional (proteínas totais e albumina) (Quadro 5).

Os dados antropométricos como idade, gênero, peso, IMC, altura, tempo de diabetes foram coletados através de entrevista direta e análise de prontuário médico (Anexo 2).

QUADRO 5. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, METODOLOGIAS, E INTERVALO DE REFERÊNCIA PARA ADULTOS SAUDÁVEIS.

ANALITO	PRINCÍPIO DO MÉTODO	CVa %	INTERVALO DE REFERÊNCIA
1,5 Anidroglucitol	Enzimático colorimétrico Glycomark	3,4	>10 µg/mL
Ácido Úrico	Colorimétrico Uricase/ Peroxidase - Trinder	1,6	2,5 – 7,0 mg/dL
Albumina	Reação de Bromocresol	1,9	3,3 – 4,7 g/dL
ALT	Ensaio cinético UV com L- aspartato, cetoglutarato, NADH e piridoxal fosfato	-	15 – 40 U/L
AST	Ensaio cinético UV com L-alanina, cetoglutarato, NADH e piridoxal fosfato	-	10 – 45 U/L
Colesterol Total*	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase (Reação de Trinder)	2,0	Desejável <190 mg/dL
Creatinina	Picrato alcalino cinético	3,2	0,5 – 1,4 mg/dL
GGT	Ensaio cinético com L-γ- glutamil-3-carbox- 4- nitronilida e p-nitroanilina	1,1	Homem: 7-58 U/L Mulher: 5-39 U/L
Glicose	Hexoquinase UV	1,9	60 – 99 mg/dL
HbA1C	Imunoturbidimétrico	0,8	4,0 – 6,0 %
HDL-colesterol**	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	3,5	Desejável ≥40 mg/dL
LDL-colesterol	Cálculo pela equação de Friedewald		Ótimo: < 100 mg/dL Limiar ótimo: 100 – 129 mg/dL Limiar elevado: 130–159 mg/dL Elevado: 160 – 189 mg/dL Muito elevado: ≥ 190 mg/dL
Log (TG/ HDL-c) - IAP***	Relação Triglicérides/ colesterol HDL		Baixo (<0,11), Intermediário (0,11 - 0,21) Aumentado (> 0,21)
nHDL-colesterol	Relação Colesterol total – HDL-c		< 130 mg/ dL: Risco intermediário < 100 mg/ dL: Risco alto < 80 mg/ dL: Risco muito alto
Proteínas Totais	Reação de Biureto	2,4	6,0 – 8,0 g/dL
Triglicerídeos	Ensaio enzimático com lipase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase com de Reação Trinder	1,9	Desejável: <150
Ureia	Ensaio cinético UV com urease, GLDH e NADH	1,9	15- 45 mg/dL

CVa, coeficiente de variação analítica interensaio, em porcentagem, para soro controle com concentração normal. *Atualização Diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose, 2017. **V Diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose, 2013 **Equação de Friedewald, LDL-colesterol = Colesterol total – HDL-colesterol – Triglicerídeos/5. ***Calculador do índice aterogênico no plasma.

Fonte: ADA. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2017. Diabetes Care. v. 40 Suppl 1, p. S11-24. 2017.

As determinações dos parâmetros bioquímicos foram realizadas em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest AS) do Laboratório Escola da UFPR ou Architect Ci8200 - Abbott, do laboratório de Imunoquímica do Hospital de Clínicas da UFPR utilizando reagentes, calibradores e controles adequados. No quadro 6, visualizam-se os exames realizados nos grupos participantes desse estudo, bem como as suas metodologias e valores de referência.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade das variáveis contínuas foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo teste “t” de Student para amostras não pareadas e bidirecionais. Estas variáveis foram representadas pela média \pm 1 desvio padrão. Variáveis que não apresentaram distribuição normal foram “normalizadas” por transformação logarítmica ou analisadas pelo teste U de Mann-Whitney, conforme apropriado. Estas variáveis foram representadas pela mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3; percentil 25%–75%).

Para comparações de variáveis categóricas descontínuas foram utilizados os testes de Chi-quadrado (χ^2); ou o teste Exato de Fischer bidirecional.

Nas análises de correlação e associação ANOVA (one - way), o modelo aplicado foi descrito por Pearson (correlação linear). Os polimorfismos em estudo foram codificados como 1 (homozigoto dominante ou mais comum), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto recessivo ou raro).

A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W-E), cálculos das frequências genótípicas e alélicas, bem como o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para os alelos de menor frequência foram realizados no programa *DeFinetti* (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Em comparações de frequências alélicas com outras populações, foi considerado similaridade uma frequência do alelo raro que se encontrava dentro do limite do IC 95%. Frequências acima ou abaixo de 95%IC foram consideradas diferentes.

O programa Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa OK, USA) foi utilizado nas análises de dados. Uma probabilidade inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo estão dispostos em sequência: 1) Caracterização das amostras; 2) Análises bioquímicas; 3) Análises moleculares.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A estatística descritiva dos parâmetros antropométricos para os grupos Controle e DM1 se encontra na tabela 1.

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS ADULTOS CONTROLES SAUDÁVEIS E PACIENTES DM1.

PARÂMETROS	CONTROLE (n=150)	DM1 (n=143)	P
Idade (anos)	44,4 ± 5,8	43,5 ± 12,9	0,450*
Gênero (H/ M)	53/97	50/93	0,947**
Altura (cm)	166,2 ± 8,9	163,3 ± 9,8	< 0,001
Peso (kg)	74,7 ± 13,4	70,90 ± 15,8	< 0,001
IMC (kg/m ²)	27,0 ± 4,1	25,8 ± 4,3	< 0,001
Etnia (%)			
Afro-brasileiro	ND	20,9	
Euro-brasileiro	ND	81,1	-
Tempo de DM1 (anos)	ND	14,8 ± 10,7	-
HFD (%)	ND	69,2	
Uso de insulina (%)	ND	95,8	-
Tabagismo (%)			-
Não fumante	ND	51,7	
Ex-fumante	ND	34,3	
Fumante	ND	14,0	
HAS (%)	ND	49,6	-
Uso de anti-hipertensivo (%)	ND	39,1	-
IAM (%)	ND	6,3	-
DAC (%)	ND	26,6	-
Dislipidemia (%)	ND	38,5	-
Uso de hipolipemiantes (%)	ND	35,0	-
Nefropatia (%)	ND	9,8	-

Resultados apresentados como média ± 1 Desvio Padrão; para variáveis com distribuição normal. Mediana (intervalo interquartil, 25% - 75%) para variáveis sem distribuição normal. P: probabilidade teste t-Student bidirecional. P*: probabilidade teste U de Mann-Whitney. **Teste do Chi-quadrado. P<0,05 é significativo e destacado em negrito. Abreviações: H, homens; M, mulheres; DM1, *Diabetes mellitus* tipo 1; n, número de indivíduos; IMC, Índice de Massa Corporal; HFD, Histórico Familiar de Diabetes; HAS, Hipertensão arterial sistêmica; IAM, Infarto agudo do miocárdio; DAC, Doença arterial coronariana; ND, Dado não disponível.

Fonte: O autor (2018).

4.1.1 Idade, Gênero e Etnia

A epidemiologia mundial da diabetes tipo 1 na infância (DM1) foi amplamente descrito na 8ª edição da Federação Internacional de Diabetes (IDF) (IDF, 2017a). Em contraste, não temos conhecimento de uma revisão semelhante sobre a epidemiologia mundial do DM1 em adultos, embora se saiba que o DM1 é conhecido por ocorrer até mais tarde em adultos (TUOMI *et al.*, 1993; ZIMMET, 1999; BORG *et al.*, 2003). Uma limitação importante da epidemiologia da DM1 em adultos é certamente a dificuldade que existe para distinguir do DM2 que requer tratamento com insulina ou do diabetes autoimune latente do adulto (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults* - LADA), quando marcadores específicos de autoimunidade não são pesquisados.

Sabe-se que a ocorrência da doença está associada a fatores modificáveis e não modificáveis, com destaque para a idade (≥ 40 anos) (FLOR; CAMPOS, 2017). Neste estudo foram avaliados pacientes com DM1 que tiveram diagnóstico com idade igual ou superior à 18 anos de idade e o grupo foi pareado por idade como grupo controle ($P=0,450$) (Tabela 1).

Foi mostrado em uma meta-análise (DIAZ-VALENCIA; BOUGNERES; VALLERON, 2015) que a incidência de DM1 em adultos é maior em homens do que em mulheres, o que contrasta com a incidência de DM1 em crianças, onde a razão sexual é em torno de um (GROUP, 2006; SOLTESZ *et al.*, 2007). Karvonen e colaboradores (1997) também descreveram um excesso do sexo masculino entre jovens adultos entre 15 e 39 anos de idade. Diferenças sexuais na exposição a possíveis impactos ambientais desencadeantes do DM1, na suscetibilidade hormonal/genética, no estilo de vida foram propostas como possíveis explicações para essa diferença (BLOHME *et al.*, 1992).

A população brasileira foi formada por uma mistura de três diferentes raízes ancestrais, ou seja, ameríndios, europeus e africanos, dificultando a identificação étnica (ou ancestralidade genética) baseada predominantemente na cor da pele (PENA *et al.*, 2011). O grupo com DM1 estudado foi composto predominantemente por 81,1% de indivíduos Euro-brasileiros, sendo os demais indivíduos Afro-brasileiros (20,9%). Esta distribuição étnica esperada é devida às características raciais da região brasileira em que foram obtidas as amostras. No estado do Paraná, a paisagem urbana e rural de várias regiões evidencia a

presença de imigrantes de várias origens, incluindo Poloneses, Italianos, Alemães, Holandeses, Ucrânicos e Japoneses (EIDAM, 2009). De acordo com o (IPARDES, 2018), a maioria da população paranaense declara-se branca, respaldando os dados analisados. Entretanto, não é possível atribuir prevalência do DM1 associada à etnia neste estudo (Tabela 1).

4.1.2 Peso, Altura e IMC

Os parâmetros peso, altura e IMC apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,001$) entre os pacientes e seus controles (Tabela 1). Nesse estudo o grupo DM1 apresentou uma média de peso relativamente menor que o grupo controle, porém ambos os grupos apresentaram a média do IMC acima da normalidade, $27,0 \text{ kg/m}^3$ para os saudáveis e $25,8 \text{ kg/m}^3$ para DM1. Os critérios de IMC propostos pela *World Health Organization - WHO* (ORGANIZATION, 2000) e pelo Ministério da Saúde - MS (BRASÍLIA, 2011), propõem que indivíduos adultos de ambos os sexos e com idade igual ou superior a 18 anos sejam classificados da seguinte forma: baixo peso (IMC $< 18,5 \text{ kg/m}^2$), normal (IMC entre $18,5$ e $24,9 \text{ kg/m}^2$), sobrepeso (IMC entre 25 e $29,9 \text{ kg/m}^2$) e obesidade (IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$). Sendo assim, analisando os dados da tabela 1, o grupo de pacientes DM1 e o grupo de controles saudáveis apresentaram um IMC acima da normalidade determinando, portanto, sobrepeso.

Indivíduos com DM1 apresentavam, como característica clínica no início da doença, baixo peso e/ou peso normal. A ocorrência de sobrepeso ou obesidade nesses pacientes durante a evolução da doença era, na maioria das vezes, um fato raro e isolado (FERNQVIST; GUNNARSSON; LINDE, 1988; CARNEIRO *et al.*, 2000). Esses conceitos vêm apresentando uma mudança gradativa, e consequente aumento significativo da prevalência de sobrepeso e obesidade em adultos, crianças e adolescentes na população mundial (INVITTI *et al.*, 2003).

Estudos como o de Corbin e colaboradores (2018), verificaram um aumento alarmante na prevalência da obesidade em pessoas com DM1. De acordo com os autores, embora a obesidade tenha sido reconhecida como um importante fator de risco para o desenvolvimento do DM2 e um catalisador de complicações, sabe-se muito pouco sobre o papel da obesidade no início e na patogênese do

DM1. No relato de Corbin e colaboradores (2018) as evidências emergentes sugerem que a obesidade contribui para a resistência à insulina, dislipidemia e complicações cardiometabólicas no DM1.

4.1.3 Histórico familiar de DM

O risco de doenças como alergia, DM1 e doença celíaca é frequentemente avaliado em termos de história familiar (KNIP *et al.*, 2014; LIU, E. *et al.*, 2014; BONIFACIO, 2015; DU TOIT *et al.*, 2015) o que identifica 10% das crianças que subsequentemente desenvolverão a condição patológica.

Estudos anteriores mostraram que a incidência de DM1 está aumentada em indivíduos que possuem um membro da família conhecido por ter a doença (HUBER *et al.*, 2008; CERNEA; DOBREANU; RAZ, 2010). O risco de DM1 é da ordem de 10 vezes maior em parentes de primeiro grau de um indivíduo com DM1 em comparação com a população geral (STANKOV; BENC; DRASKOVIC, 2013; POCIOT; LERNMARK, 2016).

Entre os parentes de primeiro grau de indivíduos com DM1, a chance de desenvolver a doença é menor que 5% naqueles indivíduos que possuem positividade para apenas um ou nenhum anticorpo específico. Sendo a chance de desenvolver DM1 maior que 90% nos portadores de HLA de risco e que são positivos para vários autoanticorpos circulantes, contra estruturas da célula β pancreática (KULMALA, 2003; ADA, 2016).

Nos indivíduos estudados com DM1, 69,2 % apresentaram histórico de diabetes familiar (pais, irmãos e avós), demonstrando considerável fator preditor de risco para o diabetes. No entanto, não foi possível a investigação da prevalência familiar entre os indivíduos pesquisados na população controle.

4.1.4 Tabagismo

Analisando os dados do estudo apresentado, 14% dos pacientes diabéticos declararam-se como fumantes. O tabagismo foi relatado por Gomes e

colaboradores (2012), com maior frequência em pacientes com DM1 na região sul do que entre os pacientes de outras regiões do país.

Para os adultos com diabetes, assim como na população em geral, o tabagismo está associado a um risco aumentado de eventos cardiovasculares e morte. Estudos prospectivos sobre diabetes relatam que o tabagismo aumentou o risco de morte em 48%, doença coronariana em 54%, AVC em 44% e infarto do miocárdio em 52% (QIN *et al.*, 2013). Pacientes com diabetes e que fumam apresentam concentrações mais altas de hemoglobina glicada - HbA1c - (NILSSON *et al.*, 2004) e têm maior probabilidade de apresentar hipoglicemia grave (HIRAI *et al.*, 2007). Em adolescentes com DM1, o tabagismo propiciou piora do controle glicêmico e está associado a um pior perfil de risco cardiovascular (SCHWAB *et al.*, 2008; GERBER *et al.*, 2013).

Não está totalmente claro se o aumento da morbidade e mortalidade em fumantes é devido ao perfil metabólico aterogênico; ou devido aos efeitos tóxicos, diretos da nicotina e de outras substâncias tóxicas, presentes nos cigarros no meio cardiovascular (CALCATERRA *ET AL.*, 2018). De fato, o fumo reduz a sensibilidade e induz a resistência à insulina; aumentando os fatores de risco cardiovasculares, como triglicérides plasmáticos elevados, diminuição do colesterol total, do HDL-C, hiperglicemia e redução das concentrações de albuminúria (ANDERSSON; ARNER, 2001; VOULGARI; KATSILAMBROS; TENTOLOURIS, 2011; BENOWITZ; BURBANK, 2016). Vários estudos mostram que o tabagismo está associado a anormalidades metabólicas e aumenta o risco de síndrome metabólica (CENA; FONTE; TURCONI, 2011; KAR *et al.*, 2016).

O cessar do tabagismo tem sido recomendada como componente rotineiro do tratamento do diabetes pela American Diabetes Association (ADA, 2019b), embora as evidências para orientar as melhores práticas sejam limitadas (TONSTAD, 2009). A frequência de indivíduos que se declararam como ex-fumantes para este estudo foi de 34,3% no grupo de pacientes DM1, sendo uma estimativa positiva na conscientização sobre os riscos de consumir o tabaco. Dados sobre o consumo de tabaco pelo grupo de controles saudáveis não estavam disponíveis.

4.1.5 Hipertensão, DAC, IAM e dislipidemia

A hipertensão arterial e o DM representam grandes problemas de saúde pública e muitas vezes coexistem na prática clínica. Há a tendência de aumento na prevalência de hipertensão e diabetes, possivelmente relacionado ao crescimento da população idosa, bem como às taxas de sobrepeso e obesidade (DEEDWANIA, 2011). A prevalência de hipertensão é de duas a três vezes maior em diabéticos do que na população geral (GARCIA-TOUZA; SOWERS, 2012; SBD, 2017).

Nos estudos sobre desenvolvimento da hipertensão arterial em pacientes diabéticos, fatores clínicos, como baixo controle metabólico, alta dose diária de insulina e sobrepeso/obesidade, são geralmente, mas nem sempre, implicados como causadores sintomáticos (BASIRATNIA *et al.*, 2012; SZADKOWSKA *et al.*, 2018).

A hipertensão em adultos foi definida pela ADA (2019c), como uma sustentada pressão sanguínea $\geq 140/90$ mmHg. A frequência de pacientes DM1 com hipertensão foi reportada por alguns estudos entre 24 a 43% (COLLADO-MESA *et al.*, 1999; MAAHS *et al.*, 2005; ROY; JANAL; ROY, 2011). Um estudo Brasileiro reportou a frequência de 31,3% em adultos com DM1 (GOMES *et al.*, 2013), sendo semelhante ao observado no presente estudo (49,6%) (Tabela 1).

O tratamento não medicamentoso da hipertensão arterial em diabéticos consiste basicamente em diminuição do peso corporal, dieta pobre em sódio, exercícios regulares, dieta rica em frutas e vegetais, o cessar do tabagismo e do consumo de álcool, além do tratamento da apneia obstrutiva do sono. A redução da circunferência abdominal com redução de peso está associada ao melhor controle da pressão arterial e a alguns parâmetros metabólicos, como lipídios e glicemia (ALESSI; WOJTA, 2013).

Em pacientes com diabetes e hipertensão, o principal determinante dos benefícios cardiovasculares dos medicamentos anti-hipertensivos é alcançar o objetivo de controle da pressão arterial (ARONOW, 2012). Para que esse objetivo seja alcançado, é necessário iniciar o tratamento com dois ou mais medicamentos de diferentes classes. A presença de doença renal deve ser estratificada para definir a melhor abordagem (SBH, 2010). Observou-se que nesse estudo 39,1% dos pacientes utilizam medicamentos anti-hipertensivos (Tabela 1).

O alto índice de mortalidade por doença cardiovascular em adultos com DM1 pode chegar a ser até 40 vezes maior que na população geral; além de ser maior em mulheres do que em homens. Tendo em conta esse elevado risco de morte é importante investigar fatores potencialmente modificáveis no desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Indicadores de risco para complicações macrovasculares, como o histórico familiar para doença arterial coronariana – DAC – permitem associar alterações cardíacas aos distúrbios glicometabólicos (LIND *et al.*, 2011). Neste estudo, 53,1 % dos pacientes com DM1 apresentaram histórico familiar de DAC (Tabela 1).

A doença cardiovascular é responsável por 65 a 70% mortes em indivíduos com DM1 (LIBBY *et al.*, 2005; SECREST *et al.*, 2010) e incorre em um aumento de 13 vezes mortalidade ajustada por idade em pacientes com DM1 em comparação com população diabética (SECREST *et al.*, 2010). A frequência do IAM neste estudo (6,3%) foi superior a reportada em um estudo Brasileiro com uma população de Minas Gerais (4%) (SOUZA *et al.*, 2018) com similar tempo de doença ($14,8 \pm 10,7$ vs $15,35 \pm 10,31$).

A dislipidemia típica é caracterizada por concentrações elevadas de colesterol total (≥ 190 mg/dL), LDL-colesterol (≥ 130 mg/dL) e triglicérides (≥ 150 mg/dL), bem como baixas concentrações de HDL colesterol (≤ 40 mg/dL). Os critérios de corte são aqueles preconizados pela Diretriz Brasileira de Dislipidemias e prevenção da Aterosclerose (FALUDI *et al.*, 2017). Em indivíduos com DM1 a presença de dislipidemia, que inclui triglicérides elevado, LDL-C elevado e HDL-c baixo, prediz presença de futuras doenças cardiovasculares, mas a prevalência de dislipidemia em indivíduos com DM1 não é maior do que na população não diabética (WADWA *et al.*, 2005; DUCA; SIPPL; SNELL-BERGEON, 2013). A dislipidemia diabética é um fator pro-aterogênico significativo (NG, 2013). No Brasil, de acordo com o estudo realizado por Gomes e colaboradores (2012), 49,7% pacientes apresentaram algum tipo de dislipidemia; valor semelhante com a verificação deste estudo (38,5 %).

Estudos envolvendo pacientes com DM1 mostraram que 41,47% (DUVNJAK; BLASLOV, 2016) e 43,5% (JENSEN *et al.*, 2016) dos pacientes faziam uso de hipolipomiantes, porcentagem superiores ao encontrado no nosso estudo, de 35% (Tabela 1). Esta baixa porcentagem pode ser justificada devido ao fato dos pacientes não estarem recebendo tratamento adequado, uma vez que um estudo

Brasileiro demonstrou que menos de 30% dos pacientes com DM1 estavam recebendo tratamento para dislipidemia agressiva, contrariando as diretrizes de prática clínica que recomendam o manejo desta condição clínica (COUTINHO; SILVA JUNIOR, 2015).

Embora os hipolipemiantes possam estar associados ao controle glicêmico prejudicado no DM1 (DUVNJAK; BLASLOV, 2016; JENSEN *et al.*, 2016), o efeito deles na prevenção de eventos cardiovasculares está bem estabelecido e reforça a recomendação dessa terapia (CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS *et al.*, 2008). De fato, a maioria dos indivíduos adultos com DM1 têm perfis lipídicos tipicamente comparáveis ou melhores que indivíduos controle não diabéticos (ARCANJO *et al.*, 2005; WADWA *et al.*, 2005). O estudo de Jensen e colaboradores (2016) mostrou que os pacientes com DM1 que receberam medicação hipolipemiante tiveram um leve aumento da HbA1c em relação aos pacientes que não receberam medicação; sugerindo possível correlação do uso desta droga com o controle glicêmico inadequado.

4.1.6 Nefropatia

A nefropatia diabética (ND) é uma das principais causas de mortalidade e agravamento da qualidade de vida dos pacientes com DM1 (BANACH *et al.*, 2015). As alterações patológicas progressivas se desenvolvem durante um longo período silencioso sem evidências de proteinúria, hipertensão ou prejuízo da taxa de filtração glomerular (TFG). Durante a fase clinicamente silenciosa, uma proporção significativa de pacientes exibe hiperfiltração renal secundária a pressão intraglomerular elevada; resultando em uma lesão glomerular seguida de microalbuminúria e declínio progressivo da taxa de filtração glomerular. ND é também um importante fator de risco para doença arterial coronariana (DAC) e mortalidade geral (BJORNSTAD *et al.*, 2015).

Foi evidenciado que, embora um mau controle glicêmico durante um longo período de tempo seja um fator importante no desenvolvimento de nefropatia diabética, hipertensão e hiperlipidemia; e fatores genéticos também estão associados ao desenvolvimento de tais complicações (MATSUNAGA-IRIE *et al.*, 2004).

A prevalência de microalbuminúria varia em média de 12% a 25% aos 10 anos de evolução de DM1, e de 30% a 40% após 20 anos com a doença. Dos pacientes com microalbuminúria, metade evolui para estágios mais avançados, enquanto o restante dos pacientes retorna aos valores normais de albuminúria (GONI *et al.*, 2016). Em contraponto ao relatado, nosso estudo observou a presença de nefropatia numa porcentagem de 9,8% dos pacientes com DM1 que apresentamem média 14,8 anos de doenças (Tabela 1).

4.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A tabela 2 apresenta os resultados estatísticos obtidos para os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo; dos grupos controle saudável e pacientes com DM1.

4.2.1 Biomarcadores de Controle Glicêmico (glicemia em jejum, HbA1c e 1,5-AG)

Os parâmetros dos biomarcadores para perfil glicêmico apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos DM1 e controle, o que caracteriza os grupos (Tabela 2). O grupo DM1 apresentou um controle glicêmico inadequado, não atingindo as metas glicêmicas preconizadas pela SBD (SBD, 2017) (glicemia em jejum <100 mg/dL, HbA1c <7% e 1,5AG >10 µg/mL).

A melhora do controle glicêmico em pacientes com DM1 reduz substancialmente o risco de complicações microvasculares e doenças cardiovasculares (LIND *et al.*, 2014). Uma meta de 8,0% para Hb1Ac já poderia ser apropriada para pacientes com histórico de hiperglicemia grave, expectativa de vida limitada, complicações micro ou macrovasculares avançadas, múltiplas comorbidades ou com DM a longo prazo. Sendo assim, torna-se difícil o controle somente com medidas recomendadas de saúde como educação, monitorização da glicemia e doses eficazes de medicamentos (SILVA, T. E.; RONSONI; SCHIAVON, 2018).

No presente estudo a média da HbA1c do grupo DM1 foi de 8,8% (Tabela 2). Andrade e colaboradores (2017), conduziu um estudo com pacientes adultos com DM1 em várias cidades das regiões sudeste, sul, centro-oeste e nordeste do

Brasil, encontrando em sua maioria um controle glicêmico inadequado (HbA1c $\geq 7,0\%$), com valor médio de HbA1c 9,4%. Braga e colaboradores (2015) também relataram valor médio da HbA1c $>8,0\%$ em pacientes adultos com DM1 avaliados nessas mesmas regiões brasileiras.

TABELA 2- PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS EM ESTUDO.

PARÂMETROS	CONTROLE (n=150)	DM1 (n=143)	P
Glicemia em jejum (mg/dL)	97,3 \pm 18,3	191,4 \pm 100,2	<0,001
HbA1c (%)	5,4 (5,2 – 5,6)	8,8 (7,6 – 9,7)	<0,001*
1,5 anidroglicitol ($\mu\text{g/mL}$)	108,2 (102,5 – 114)	4,1 (2,3 – 5,9)	<0,001*
Colesterol total (mg/dL)	175 (158 – 195)	171 (152 – 194)	0,238*
HDL-C (mg/dL)	53,9 \pm 13,7	52,6 \pm 16,6	0,458
LDL-C (mg/dL)	95,5 \pm 27,7	101,8 \pm 35,1	0,089
nHDL-C (mg/dL)	121,5 (105 – 147)	119 (99 – 139)	0,432*
Log (TG/HDL-c)	0,91 \pm 0,65	0,70 \pm 0,76	<0,001
IAP (mmol/L)	0,03 \pm 0,28	-0,06 \pm 0,32	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	138 (88 – 174)	89 (69 – 131)	<0,001*
Albumina (g/dL)	3,9 \pm 0,2	4,1 \pm 0,4	<0,001
Proteína total (g/dL)	6,9 \pm 0,4	8,1 \pm 0,9	<0,001
Ácido úrico (mg/dL)	4,6 \pm 1,2	3,9 \pm 1,5	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,56 (0,48 – 0,67)	0,85 (0,80 – 1,00)	<0,001*
Ureia (mg/dL)	23 (20 – 27)	32 (25 – 39)	<0,001*
ALT (mg/dL)	15 (11 – 19)	17 (9 – 22)	<0,431*
AST (mg/dL)	21 (17 – 25)	16 (12 – 21)	<0,001*
GGT (mg/dL)	27 (20 – 42)	24 (16 – 32)	<0,081*

Resultados apresentados como média \pm 1 Desvio Padrão, para variáveis com distribuição normal. Mediana (intervalo interquartil, 25% - 75%), para variáveis sem distribuição normal. P: probabilidade utilizando o teste t-Student bidirecional. P*: probabilidade utilizando o teste U de Mann-Whitney. P<0,05 é significativo e destacado em negrito. IAP: índice aterogênico do plasma com parâmetros em mmol/L. Abreviações: DM1, *Diabetes mellitus* tipo 1; Controle, adultos saudáveis >18 anos; n, número de indivíduos.

Fonte: O autor (2018).

Entre os preditores de controle glicêmico o 1,5-anidroglicitol (1,5-AG), que é um monossacarídeo obtido principalmente a partir de fontes dietéticas, reflete de maneira favorável a glicemia média ao longo dos últimos 2 a 14 dias

(PARRINELLO; SELVIN, 2014). O 1,5-AG pode ser utilizado para avaliação e monitoramento da glicemia pós prandial em uma população diabética e para correção das concentrações plasmáticas de glicose ao longo de um período de 1 a 2 semanas. Quando a glicemia está elevada, a reabsorção de 1,5-AG nos túbulos renais é inibida competitivamente, levando a um aumento na excreção de 1,5-AG e a uma diminuição das suas concentrações plasmáticas (YING *et al.*, 2018). O intervalo de referência para 1,5-AG na população brasileira saudável é 12,66-45,86 µg/mL (WELTER, M. *et al.*, 2018). O valor do 1,5-AG cai para 10 µg/mL em pacientes com glicosúria (YAMANOUCHI; AKANUMA, 1994; BUSE *et al.*, 2003).

Neste estudo a concentração mediana de 1,5-AG para os indivíduos com DM1 foi de 4,1 µg/mL (2,3 - 5,9), valor semelhante encontrado em outros estudos envolvendo pacientes DM1 (5,3 µg/mL e 3,8 µg/mL) (JANUSZEWSKI *et al.*, 2012; SEOK *et al.*, 2015). Valores tão baixos sugerem picos hiperglicêmicos, excursões glicêmicas principalmente no estado pós-prandial (DUNGAN *et al.*, 2006). Além disso, estudos recentes indicam que a glicemia pós-prandial pode ser um fator de risco independente para o desenvolvimento de complicações macrovasculares (HANEFELD *et al.*, 1996; MUGGEO *et al.*, 2000; TEMELKOVA-KURKTSCHIEV *et al.*, 2000). Flutuações glicêmica em curto prazo sugerem riscos de complicações em longo prazo no diabetes (BROWNLEE; HIRSCH, 2006).

A fim de prevenir complicações, o tratamento do diabetes requer uma abordagem multifatorial com estratégias para melhorar o controle glicêmico inadequado. Ainda existe uma grande lacuna entre as diretrizes de tratamento baseadas em evidências e sua incorporação à prática clínica, uma vez que apenas uma minoria dos pacientes atinge os três alvos de tratamento (HbA1c, pressão arterial e LDL-C) (LITHOVIUS *et al.*, 2015).

4.2.2 Perfil Lipídico e análise do índice aterogênico do plasma – IAP

O perfil lipídico é determinado pela quantificação sérica do colesterol total (CT), HDL-C, LDL-C e triglicérides. A hiperglicemia persistente é um fator de risco modificável que comprovadamente afeta as concentrações plasmáticas de colesterol (ROBINSON, 2009). Quando o paciente com DM1 faz o tratamento correto com insulina dificilmente ocorre alguma alteração negativa no metabolismo

lipídico (ATHYROS *et al.*, 2018). Essa conduta terapêutica pode ser confirmada através dos dados da tabela 2 do nosso estudo, onde 95,8% dos pacientes utilizam insulina de forma contínua.

Os parâmetros analisados para o perfil lipídico (CT, HDL-C, LDL-C e não HDL-C) não demonstraram valores séricos significativamente diferentes entre os grupos estudados, exceto para triglicérides e índice aterogênico do plasma (IAP) que apresentaram diferenças significativas ($P < 0,001$) (Tabela 2), mas ainda dentro do intervalo de referência (Quadro 5). Estes valores de perfil lipídico dos pacientes com DM1 em relação ao grupo controle foram reportados em outros estudos (ARCANJO *et al.*, 2005; WADWA *et al.*, 2005). Embora o perfil lipídico dos pacientes com DM1 tenda a ser melhor do que o perfil dos pacientes com DM2, estudos (ORCHARD *et al.*, 2001; HAFFNER; AMERICAN DIABETES, 2003; GRUNDY *et al.*, 2004) sugerem necessidade de redução mais agressiva dos lipídios dos pacientes DM1 para diminuir o risco de DAC. Uma proporção significativa de pacientes DM1 adultos com doenças cardiovasculares tem concentrações plasmáticas de LDL-C normal (LIBBY, 2005; SACHDEVA *et al.*, 2009). Mais estudos são necessários para explicar o paradoxo de menor lipemia/lipidemia e maior mortalidade por DAC nos pacientes DM1 (KROLEWSKI *et al.*, 1987; MOSS; KLEIN; KLEIN, 1991; SECREST *et al.*, 2010; SLIM, 2013).

A utilização do não HDL-c também serve como parâmetro para avaliação das dislipidemias, que pode ser obtido subtraindo o valor de HDL-c do valor de CT (não HDL-c = CT - HDL-c) e fornece uma única medida de todas as lipoproteínas aterogênicas contendo Apo B, LDL-C, VLDL, IDL e Lp(a) (KURIYA *et al.*, 2013). Este parâmetro pode ser utilizado na avaliação dos pacientes dislipidêmicos, principalmente naqueles com concentrações de triglicérides superiores a 400 mg/dL (FALUDI *et al.*, 2017). Conforme dados do nosso estudo (Tabela 2), este parâmetro foi semelhante entre os grupos DM1 e controles saudáveis.

A relação logarítmica (TG/HDL-c), conhecida como o índice aterogênico (IAP) ou de Castelli, é um importante componente e indicador de risco vascular (ROMERO-AROCA *et al.*, 2012). Os indivíduos são agrupados em três níveis: baixo risco ($< 0,11$), intermediário ($0,11-0,21$) e risco aumentado ($> 0,21$) (AKBAS *et al.*, 2014). Baliarsingh e colaboradores (2013) mostraram que as concentrações plasmáticas de ácido úrico estão positivamente associadas ao IAP em adultos saudáveis. Esta associação é explicada pela associação negativa que ocorre com

HDL-C (ISHIZAKA *et al.*, 2005) e a positiva com a hipertrigliceridemia (RUSSO *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997; CONEN *et al.*, 2004). Nosso estudo sugere um baixo risco de doença cardiovascular para ambos os grupos, sendo que valor médio de IAP apresentou-se abaixo de 0,11 (controle = 0,03 mmol/L e DM1 = -0,06 mmol/L) (Tabela 2) e os valores de ácido úrico sérico mantiveram-se dentro do intervalo de referência (Quadro 5).

De fato, as doenças cardiovasculares são a maior ameaça às complicações diabéticas e os diabéticos possuem maior probabilidade de morrer de alterações cardíacas relacionadas do que os indivíduos não diabéticos, embora o DM1 esteja associado a um perfil lipídico favorável (NORHAMMAR *et al.*, 2004; KVAN *et al.*, 2007). As dificuldades em prevenir complicações cardiorrenais no DM1, ocorrem pela impossibilidade de identificar com precisão pacientes de alto risco com sintomas pré-clínicos (TASKINEN, 1992). Em situações em que outros parâmetros de risco aterogênico parecem normais, o IAP pode ser a alternativa diagnóstica (NWAGHA *et al.*, 2010). Existem evidências de que a hipertrigliceridemia é um importante fator de risco de complicações vasculares no DM1 (RUTLEDGE *et al.*, 2010; MILLER *et al.*, 2011), mas em qual extensão os triglicerídeos contribuem para complicações vasculares fora da faixa de hipertrigliceridemia é menos claro. Bjornstad e colaboradores (2014), num estudo prospectivo com uma coorte de indivíduos DM1 mostraram que o valor do triglicerídeo em jejum (baixos a normais) foi o único marcador lipídico a predizer independentemente tanto para a progressão da calcificação da artéria coronária quanto para a albuminúria incidente durante 6 anos. Embora a independência do triglicerídeo como um mediador causal da doença cardiorrenal permaneça controversa, as concentrações plasmáticas de triglicerídeos parecem fornecer informações exclusivas sobre o risco, de forma independente dos fatores de risco convencionais (LDL-C, HDL-C e nHDL-C) no DM1.

Contudo, em pacientes com DM1, a capacidade preditiva das variáveis lipídicas difere substancialmente dependendo do sexo, função renal e controle glicêmico. Em pacientes normoalbuminúricos, as razões das lipoproteínas e lipídios aterogênicos e antiaterogênicos foram mais fortes preditores da incidência de um evento cardiovascular, enquanto que em pacientes macroalbuminúricos nenhum benefício adicional foi obtido das razões (TOLONEN *et al.*, 2014).

4.2.3 Biomarcadores de Estado Nutricional (albumina e proteínas totais)

Neste estudo o valor das proteínas totais e albumina foi significativamente maior no grupo DM1 em relação ao grupo saudável ($P < 0,001$) (Tabela 2). Tanto as concentrações de proteínas totais quanto de albumina se encontraram dentro do intervalo de referência (Quadro 5).

A albumina sérica humana (HSA) é a proteína plasmática mais abundante no sistema circulatório (RASHEED; ALI, 2006). A hipoalbuminemia pode resultar de proteinúria substancial, má absorção de alimentos ou deficiência hepática. A baixa concentração de albumina é preditora de comorbidade mais grave e mortalidade no diabetes, e acredita-se que a melhora do estado nutricional e o tratamento de outras possíveis causas de hipoalbuminemia nos pacientes diabéticos é importante (HELVE *et al.*, 2014). A análise conjunta desses parâmetros (albumina e proteínas totais), sugere que não há sinais de perda proteica ou deficiência nutricional nos grupos analisados (SHIMADA, 2013).

No DM1, a concentração de albumina está diminuída e a administração de insulina é necessária para evitar a hipoalbuminemia (JEFFERSON *et al.*, 1983; DE FEO; GAISANO; HAYMOND, 1991). Estudos mostraram que a insulina estimula a produção de albumina hepática transcrição pela ativação da transcrição gênica (PEAVY; TAYLOR; JEFFERSON, 1978; JEFFERSON *et al.*, 1983; FLAIM *et al.*, 1985; PEAVY; TAYLOR; JEFFERSON, 1985; HUTSON *et al.*, 1987; LLOYD *et al.*, 1987; DE FEO; GAISANO; HAYMOND, 1991; KIMBALL; HORETSKY; JEFFERSON, 1995), contudo o mecanismo detalhado pelo qual a insulina exerce este efeito não foi descrito.

4.2.4 Perfil Renal (ácido úrico, creatinina e ureia)

Os valores de ureia e creatinina deste estudo apresentaram-se dentro do intervalo de referência (Quadro 5), sugerindo que não há alterações relevantes na função renal. Estes biomarcadores apresentaram concentrações séricas significativamente maiores ($P < 0,001$) no grupo DM1 quando comparado ao grupo controle (Tabela 2). Achados similares foram descritos por Krolewski, Gohda e

Niewczas (2014), pacientes DM1 normoalbuminúricos e microalbuminúricos apresentaram concentrações medianas de creatinina de 0,76 mg/dL e 0,79 mg/dL, respectivamente. Domingueti e colaboradores (2018) observaram valores semelhantes de creatinina semelhantes (0,81 a 1,02 mg/dL) e ureia (31 a 42 mg/dL) em uma população Brasileira de DM1 com a média de 20±6 anos de doença.

A ureia é o principal metabólito nitrogenado derivado da degradação de proteínas, no entanto, vários fatores podem influenciar suas concentrações plasmáticas além da doença renal (STEVENS; LEVEY, 2005; CIRILLO, 2010). Um valor de creatinina dentro do intervalo de referência não garante que o paciente tenha função renal normal, particularmente pacientes com extremos de idade e tamanho corporal (MACCALLUM, 2014). Em pessoas com diabetes, a taxa de filtração glomerular (TFG), geralmente está abaixo da metade do valor normal antes que a creatinina sérica exceda a faixa normal de referência (SHEMESH *et al.*, 1985).

Inúmeros biomarcadores de função renal são usados para diagnosticar nefropatia diabética no DM1, incluindo concentração de albumina excretada na urina (processo de doença supostamente precoce) e concentração de creatinina sérica (processo de doença tardia). Esses marcadores indicam presença/ausência da nefropatia; e em estudos epidemiológicos podem quantificar o risco de progressão para doença renal terminal ou risco de morte. No entanto, sua utilidade para prever estes desfechos em pacientes com DM1 é limitada, pois são inespecíficos para predizer declínio futuro da função renal e a progressão para estágio final de doença renal (KROLEWSKI; GOHDA; NIEWCZAS, 2014).

As concentrações de ácido úrico foram significativamente maiores ($P < 0,001$) no grupo controle em comparação ao grupo DM1 (Tabela 2). Este mesmo efeito foi encontrado por Lytvyn e colaboradores (2017), concentrações mais baixas de ácido úrico nos pacientes diabéticos.

Devido a mecanismos ainda não totalmente compreendidos, pacientes com DM1 geralmente apresentam concentrações plasmáticas diminuídas de ácido úrico quando comparados com indivíduos saudáveis ou com indivíduos DM2 (GOLEMBIEWSKA *et al.*, 2005). Estes dados foram reforçados em nosso estudo (Tabela 2). Uma possível causa é glicosúria, levando à uricosúria mediada pela ativação do transportador de glicose 9 (GLUT9) (LYTVYN *et al.*, 2015). Por outro

lado, um aumento na concentração de ácido úrico é associado a uma diminuição na TFG (PIZARRO *et al.*, 2018).

4.2.5 Perfil hepático (ALT, AST e GGT)

As atividades das enzimas hepáticas, alanina amino transferase (ALT) e gama glutamil transferase (GGT), não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. No entanto, a atividade da enzima aspartato amino transferase (AST) foi significativamente maior no grupo de controles saudáveis (Tabela 2). Ainda assim, os valores para estes parâmetros hepáticos apresentaram-se dentro dos respectivos intervalos de referência (Quadro 5).

O acúmulo de glicogênio no fígado do paciente diabético mal controlado é discutido como um dos fatores da disfunção hepática, frequentemente observado nos pacientes em coma diabético (VALLANCE OWEN, 1952); e pacientes com cetoacidose diabética (CAD) que apresentam hepatomegalia (GOODMAN, 1953). A deposição de glicogênio no fígado durante a CAD é causada pela hiperglicemia e pela instabilidade na administração de insulina (BRONSTEIN; KANTROWITZ; SCHAFFNER, 1959). Uma consequente elevação das transaminases hepáticas AST e/ou ALT; deposição de gordura no fígado e inadequada terapia com insulina são agravantes do DM1 (TAKAIKE *et al.*, 2004).

Quanto mais altas as atividades de ALT e/ou AST, maior o risco da doença do fígado gorduroso de fator não alcoólico e esteatose hepática não alcoólica, mas alguns estudos indicam que pacientes com marcadores hepáticos normais também podem apresentar características histológicas que representam risco de progressão de lesão hepática (BULUM *et al.*, 2011). A doença do fígado gorduroso de fator não alcoólico aumenta o risco de doença cardiovascular e dificulta o alcance dos objetivos glicêmicos, uma vez que está associada à resistência à insulina (BARROS *et al.*, 2017).

Em pacientes com DM1 as concentrações plasmáticas elevadas de triglicérides são um parâmetro relevante com associação direta com as atividades enzimáticas de ALT, mesmo após correção com uso de drogas hipolipemiantes. Para cada aumento de 10 mg/dL nas concentrações de triglicérides, a atividade enzimática da ALT aumenta 0,5 UI/L (JOHNSON *et al.*, 2013).

O baixo valor de ácido úrico sérico, a progressão da idade, e a HbA1c aumentada em pacientes DM1, também mostram uma relação positiva com o leve aumento da atividade sérica de ALT. O ácido úrico é um produto do metabolismo da frutose no fígado e demonstrou estar associado com inflamação sistêmica, resistência à insulina e doença do fígado gorduroso de fator não alcoólico (YUAN *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2016).

4.3. ANÁLISES MOLECULARES

As frequências genótípicas e alélicas do gene *CTLA-4* para os polimorfismos em estudo nos grupos de indivíduos adultos controles saudáveis e com DM1 estão em equilíbrio com o princípio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$), sendo apresentadas respectivamente nas tabelas 3 e 5. De acordo com este princípio, a variação genética de uma população permanece constante de uma geração para a seguinte na ausência de fatores desestabilizantes. Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg são indicações de casamentos consanguíneos, estratificação populacional ou até problemas na genotipagem das amostras analisadas (RODRIGUEZ; GAUNT; DAY, 2009).

4.3.1 Polimorfismo rs231775 (+49A/G) do gene *CTLA-4*

Não houve diferença significativa entre as frequências genótípicas ($p = 0,146$) e alélicas ($p = 0,633$) para o polimorfismo +49A/G (rs231775) do gene *CTLA-4* entre os grupos estudados (Tabela 3).

Com base nos dados apresentados, o polimorfismo rs231775 não sugere associação da população adulta com DM1 neste estudo.

A associação do polimorfismo +49A/G (rs231775) no gene *CTLA-4* e o diabetes autoimune vem sendo relatada de forma variada. No entanto, trata-se ainda de uma associação controversa, pois alguns autores a descrevem como evidente enquanto outros autores a referem como uma fraca associação. A análise de indivíduos saudáveis e doentes divididos em grupos multiétnicos produziram resultados inconsistentes, em particular, a respeito da relação de transmissão

preferencial do alelo G para pacientes diabéticos (BOUQBIS *et al.*, 2003; TURPEINEN *et al.*, 2003; HALLER *et al.*, 2004).

TABELA 3 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs231775 DO GENE *CTLA-4*, NAS AMOSTRAS EM ESTUDO.

Polimorfismo		Controle (n= 150)	DM1 (n= 143)	P
(rs231775) A>G CTLA-4	A/A	60 (40,0 %)	53 (37,0 %)	0,146*
	A/G	62 (41,3 %)	73 (51,0 %)	
	G/G	28 (18,6 %)	17 (11,9 %)	
Frequência do Alelo [95% IC]	G	39,3 [34,0 - 45,0]	37,4 [32,0 - 43,0]	0,633*
Dominante	AA/ AG+GG	60/90	53/90	0,606
Recessivo	AG+AA /GG	122/28	126/17	0,108

Valores dos genótipos são n (%); 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P*, probabilidade, teste de χ^2 . Frequências genotípicas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2) para o polomorfismo rs231775 no grupo controle (P=0,101) e DM1 (P=0,281).

Fonte: O autor (2018).

Estudos anteriores sobre a variante polimórfica rs231775 do gene *CTLA-4* e o aumento do risco para o DM1 sugerem associação significativa com presença do alelo de menor frequência G e/ou do genótipo GG em pacientes de origem Caucasiana em variadas populações. Essa associação foi mostrada em diferentes etnias, como Alemã (WOOD *et al.*, 2002), Chinesa (JIN *et al.*, 2015), Estoniana (HALLER *et al.*, 2004; HALLER *et al.*, 2007; KISAND; UIBO, 2012), Francesa (ONGAGNA *et al.*, 2002), Indiana (PHILIP; ISABEL, 2011; KUMAR *et al.*, 2015), Iraniana (MOJTAHEDI *et al.*, 2005; KHOSHROO *et al.*, 2017), Japonesa (LIANG *et al.*, 2004; KAWASAKI *et al.*, 2008), Libanesa (EI WAFAI *et al.*, 2011), Norte Americana (REDDY *et al.*, 2011), Polonesa (WITAS; JEDRYCHOWSKA-DANSKA; ZAWICKI, 2010) e Tunisiana (BENMANSOUR *et al.*, 2010).

Por outro lado, em concordância com o nosso estudo, não foi observado associação significativa entre polimorfismo rs231775 e o DM1, nas populações Argentina (CAPUTO *et al.*, 2005), Brasileira (FERREIRA *et al.*, 2009) (TAVARES *et al.*, 2015; WELTER, M. , 2018), Chilena (BALIC *et al.*, 2009), Coreana (JUNG *et al.*, 2009), Indiana (BANIASADI *et al.*, 2006), Marroquina (BOUQBIS *et al.*, 2003) e Portuguesa (LEMOS *et al.*, 2009).

Três estudos realizados com população Brasileira também não encontraram associação entre o polimorfismo +49A/G e o risco para o DM1, contudo estes estudos avaliaram pacientes que tiveram o diagnóstico do DM1 em idades inferiores a 18 anos (HAUACHE *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2009) (WELTER, M., 2018). Um estudo envolvendo a população Libanesa reportou não ter encontrado o genótipo GG em pacientes com DM1 com diagnóstico de DM depois dos 13 anos de idade, em discordância com nossos resultados, onde as frequências alélicas e genótípicas desse polimorfismo foram semelhantes nos indivíduos afetados com DM1 e nos controles saudáveis (Tabela 4).

O DM1 é uma síndrome bastante heterogênea, com variabilidade considerável na idade de início, no começo abrupto e no perfil de autoanticorpos. Estudos de ligação do genoma completo em DM1 confirmaram essa heterogeneidade genética (VILLANO *et al.*, 2009). Alternativamente, a heterogeneidade também pode apontar para algum outro polimorfismo “causal” em desequilíbrio de ligação variável com o alelo G; em diferentes populações no mesmo gene ou em genes vizinhos, como por exemplo o polimorfismo 60C/T em *CTLA-4* ou entre *CTLA-4* e *PTPN22* (HIGGINS; THOMPSON, 2002). O gene *CTLA-4* está localizado próximo a duas outras regiões de susceptibilidade ao DM1, a 2q31 e a 2q34 e os genes codificadores de *CD28* e *PTPN22* podem ser considerados genes candidatos de susceptibilidade para o DM1 (MORAHAN *et al.*, 1996). Essa proximidade com outros genes e regiões de susceptibilidade podem explicar a fraca ou ausente associação do gene *CTLA-4* com o DM1 em algumas populações (MARRON *et al.*, 1997; BADENHOOP *et al.*, 1999).

A tabela 4 apresenta uma comparação das frequências genótípicas e alélicas obtidas neste estudo, para o polimorfismo rs231775, com dados de outras populações encontrados na literatura.

Houve similaridade na frequência de MAF do nosso estudo para os grupos controle e DM1 com as populações Argentina (35,1% e 36,2%), Indiana (35,8% e 37,7%), Chilena (34,4% e 35,6%), Brasileira do Nordeste (35,0% e 38,0%) e Sul (39,3% e 39,4%) e Americana (38,0 e 42,0%). Contudo, as frequências foram inferiores às descritas para populações Asiáticas e Iraniana e inferiores às descritas para a população Marroquina (Tabela 4). Em um estudo de meta-análise (KAVVOURA; IOANNIDIS, 2005) foi relatado que as porcentagens médias do alelo G estavam presentes em 55,4% da população de origem Asiática, 36,2 %,

Europeia, 33,6% Norte Africana/Oriente médio, 20,6% Africana e 45,2% em povos originados do Pacífico.

TABELA 4 - POLIMORFISMO rs231775 DO GENE *CTLA-4* COM DADOS DA LITERATURA.

CTLA-4 rs231775			Genótipo (%)			Alelo MAF (%)
Grupo étnico	Características	N	AA	AG	GG	G
Presente estudo	DM1	143	37,0	51,0	11,9	37,4
	Controle	150	40,0	41,3	18,2	39,3
Marroquinos – (norte da África) (BOUQBIS <i>et al.</i> , 2003)	DM1	118	50,0	44,0	6,0	28,0
	Controle	114	52,0	41,0	7,0	28,0
Argentinos (KISAND; UIBO, 2012)	DM1	123	43,9	39,8	16,3	36,2
	Controle	168	42,3	45,2	12,5	35,1
Indianos (BANIASADI <i>et al.</i> , 2006)	DM1	130	38,5	47,7	13,8	37,7
	Controle	180	42,2	43,9	13,9	35,8
Chilenos (BALIC <i>et al.</i> , 2009)	DM1	300	41,6	45,5	12,9	35,6
	Controle	310	44,5	42,2	13,2	34,4
Coreanos (JUNG <i>et al.</i> , 2009)	DM1	176	13,6	33,0	53,4	69,9
	Controle	90	14,4	34,4	51,1	68,3
Portugueses (LEMOS <i>et al.</i> , 2009)	DM1	207	39,6	45,9	14,5	37,4
	Controle	249	44,6	43,4	12,0	33,7
Brasileiros – (Sudeste) (FERREIRA <i>et al.</i> , 2009)	DM1	49	53,06	40,81	6,12	26,5
	Controle	48	45,83	43,75	10,41	32,2
Brasileiros – (Nordeste) (TAVARES <i>et al.</i> , 2015)	DM1	204	40,2	44,6	15,2	38,0
	Controle	305	41,6	45,9	12,5	35,0
Brasileiros – (Sul) (WELTER, M., 2018)	DM1	151	40,4	40,4	19,2	39,4
	Controle	169	35,5	50,3	14,2	39,3
Alemães (WOOD <i>et al.</i> , 2002)	DM1	176	33,5	47,7	18,8	42,6
	Controle	220	45,0	45,2	11,8	33,4
Franceses (ONGAGNA <i>et al.</i> , 2002)	DM1	62	79,0	16,1	4,9	24,2
	Controle	84	16,7	32,1	51,2	64,3
Japoneses (LIANG <i>et al.</i> , 2004)	DM1	16	0	44,0	56,0	78,0
	Controle	40	7,0	68,0	25,0	59,0
Iranianos (MOJTAHEDI <i>et al.</i> , 2005)	DM1	109	19,3	71,5	9,2	45,0
	Controle	331	44,2	45,0	10,8	33,4
Japoneses (KAWASAKI <i>et al.</i> , 2008)	DM1	91	7,7	39,6	53,7	53,7
	Controle	369	16,5	50,4	33,1	33,1
Poloneses (WITAS <i>et al.</i> , 2010)	DM1	75	26,5	49,8	23,7	48,5
	Controle	78	40,8	51,6	7,6	33,4
Tunisianos (BENMANSOUR <i>et al.</i> , 2010)	DM1	228	42,9	36,4	20,7	38,8
	Controle	193	53,8	35,7	10,5	28,2
Americanos (REDDY <i>et al.</i> , 2011)	DM1	1434	-	-	-	42,0
	Controle	1864	-	-	-	38,0
Indianos (sul da Índia) (PHILIP; ISABEL, 2011)	DM1	53	9,4	56,6	33,9	62,0
	Controle	53	60,4	28,3	11,3	25,0
Libaneses (EI WAFAI <i>et al.</i> , 2011)	DM1	39	23,1	53,8	23,1	50,0
	Controle	46	54,34	45,66	0	22,9

Estonianos (KISAND; UIBO, 2012)	DM1	154	26,0	48,0	26,0	50,0
	Controle	229	29,7	54,1	16,2	36,2
Chineses (JIN <i>et al.</i> , 2015)	DM1	402	6,4	48,3	45,3	69,4
	Controle	482	14,9	50,0	35,1	60,1
Indianos (norte da Índia) (KUMAR <i>et al.</i> , 2015)	DM1	232	40,95	43,53	15,52	37,3
	Controle	305	55,4	38,0	6,6	25,6
Iranianos (KHOSHROO <i>et al.</i> , 2017)	DM1	40	28,2	25,64	46,15	58,9
	Controle	40	32,5	37,5	30,0	49,7
Americanos	Saudáveis	33546	-	-	-	46,4
Asiáticos	Saudáveis	47986	-	-	-	44,4
Europeus	Saudáveis	133864	-	-	-	40,6
Africanos (dbSNP, 2018)	Saudáveis	15290	-	-	-	37,4

Em negrito: dados obtidos neste estudo e as frequências do alelo menos frequente (G) que são similares ao Intervalo de Confiança (95%); DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1. MAF: alelo de menor frequência. - : dados não disponíveis. dbSNP, 2018), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

Fonte: O autor (2018).

Enquanto o polimorfismo rs231775 tem sido significativamente associado ao aumento do risco para o DM1, particularmente na população Caucasiana e do Oriente Médio, estudos com coortes maiores para indivíduos indianos e Africanos têm se mostrado necessários a fim de testar com maior confiabilidade o efeito desse polimorfismo nessas populações (WANG *et al.*, 2014). Assim, mais pesquisas prospectivas são necessárias para examinar o efeito dessa variante no DM1 a fim de que possa ser realizada uma conclusão abrangente e fundamentada. Outros fatores de análise também devem ser considerados, entre eles a idade, o sexo, o estilo de vida, a progressão familiar e a ancestralidade étnica (ANJOS, S. *et al.*, 2002).

A influência de fatores genéticos no desenvolvimento do DM1 e suas complicações crônicas relacionadas não são completamente entendidas devido às diferenças nas frequências de alelos relacionados à doença. Isso pode refletir na variação da incidência do DM1 em diferentes populações no mundo. Essa variação alélica também pode estar relacionada ao histórico de ancestralidade, taxas de migração e miscigenação entre os povos (BORCHERS; UIBO; GERSHWIN, 2010; SPANAKIS; GOLDEN, 2013). A maioria dos estudos genéticos em DM1 foi realizada em populações homogêneas (ERLICH *et al.*, 2008; NOBLE; VALDES, 2011). Assim, é importante realizar estudos em populações mistas, como o Brasil, com o objetivo de avaliar a relação entre ancestralidade e frequências alélicas (YU *et al.*, 2012; TAKEZAWA *et al.*, 2014).

Em 2000, Alves-Silva e colaboradores através de um estudo sobre ancestralidade, utilizando o DNA mitocondrial da população Brasileira, conseguiu identificar que a contribuição genética da população nativa Ameríndia era maior na região norte (54%), a impressão genética Africana era maior na região Nordeste (44%) e a ancestralidade de origem Europeia foi maior na região sul (66%). A região sudeste obteve maior heterogeneidade em sua população sem demonstrar predileção em sua origem patriarcal (33% Ameríndios, 34% Africanos e 31% Europeus).

Através de outro estudo Brasileiro (MOURA *et al.*, 2015) com 38 diferentes populações do nosso país concluiu-se que a ancestralidade Europeia é a que mais contribuiu para a origem genética dos Brasileiros, seguida da ancestralidade Africana, e em menor porcentagem a população nativa Ameríndia. A região Sul possui o maior percentual de ancestralidade Europeia (77%), enquanto que a região do Nordeste possui 58% desta contribuição Europeia.

Esta maior heterogeneidade reportada para a região Sudeste poderia justificar a diferença de frequência do MAF (FERREIRA *et al.*, 2009) com relação ao nosso estudo e outros dois estudos Brasileiros realizados na região Sul WELTER, M., 2018) e Nordeste (TAVARES *et al.*, 2015).

Tavares e colaboradores (2015), não reportaram a porcentagem de indivíduos euro-brasileiros em seu estudo realizado no Nordeste do Brasil, porém foi possível observar resultados muito similares entre as porcentagens do alelo de menor frequência G nos pacientes com DM1 (38,0%), tanto no estudo realizado no Nordeste como neste presente estudo na região Sul (37,4%). Em ambos não foi possível a associação do polimorfismo com o risco maior ao DM1.

Num estudo nas cinco regiões do Brasil os participantes com DM1 obtiveram um padrão de ancestralidade genética no qual pôde ser percebida uma maior porcentagem de ascendência europeia, seguida por ancestralidade Africana e nativa Ameríndia (GOMES *et al.*, 2018); similar com nosso estudo.

Entre as limitações em nosso estudo relatamos o tamanho amostral relativamente pequeno para o ensaio populacional. Uma meta-análise mostrou que os estudos maiores (com menor variância) apresentaram resultados mais conservativos para a associação do alelo G com DM1, em comparação aos estudos menores que utilizaram número amostral menor que 150 indivíduos, os quais mostraram estimativas de OR mais proeminentes, e depois de removidos, o

OR foi de 1,40 (95% IC: 1,28-1,54). Esta meta-análise afirma que o polimorfismo +49A/G é claramente associado ao DM1 em pacientes com início da doença com menos de 20 anos de idade (KAVVOURA; IOANNIDIS, 2005).

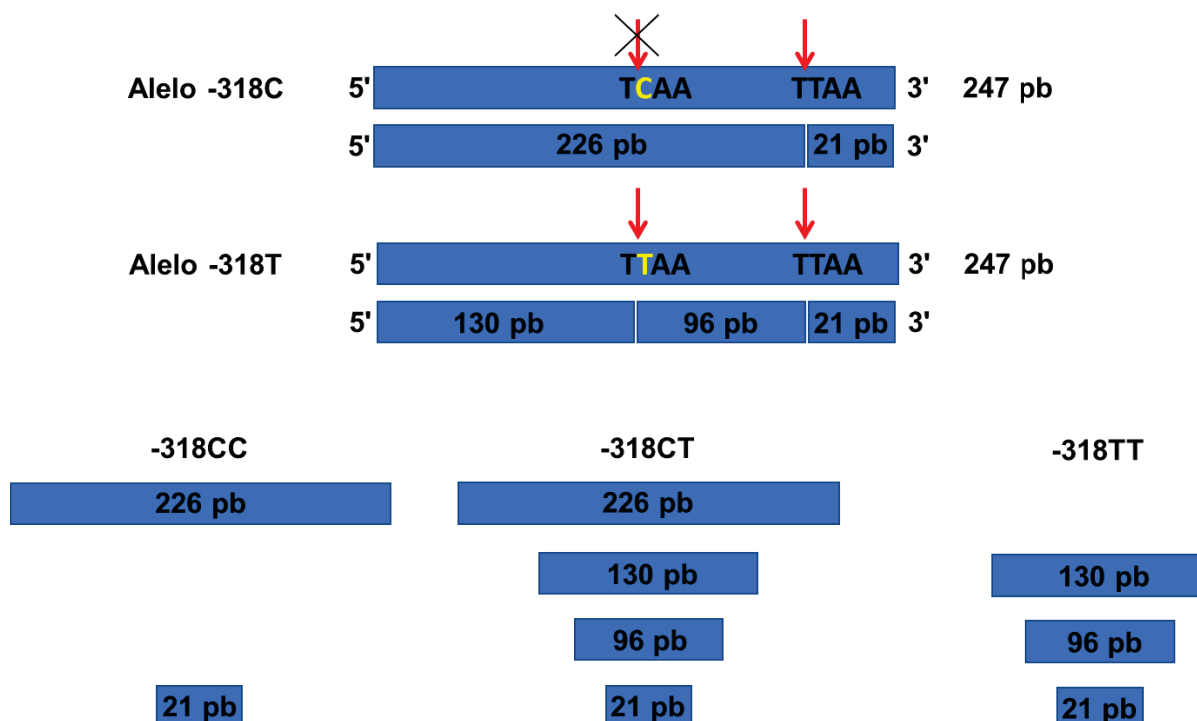
Análises de variância (ANOVA) realizadas para este polimorfismo na busca de associação dos genótipos com as concentrações séricas de biomarcadores clínicos nas amostras em estudo não revelaram nenhuma associação significativa.

Contudo, o polimorfismo +49A/G pode não ser a verdadeira variante associada à doença, mas um marcador no desequilíbrio de ligação com a variante causal, e os achados discrepantes podem refletir forças variáveis de desequilíbrio de ligação em diferentes populações (LEMOS *et al.*, 2009).

4.3.2 Polimorfismo rs5742909 (-318C/T) do gene *CTLA-4*

A genotipagem do polimorfismo rs5742909 no gene *CTLA-4* foi feita por reação de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism Read*), onde o fragmento de 247 pb foi digerido com a enzima de restrição *MSE I*. Essa enzima reconhece a sequência nucleotídica TTAA, onde a clivagem ocorrerá uma vez no fragmento se o alelo C estiver presente e duas vezes quando o alelo T estiver presente (Figura 8).

FIGURA 8. MAPA DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO E GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA *MSE I* PARA O POLIMORFISMO rs5742909.

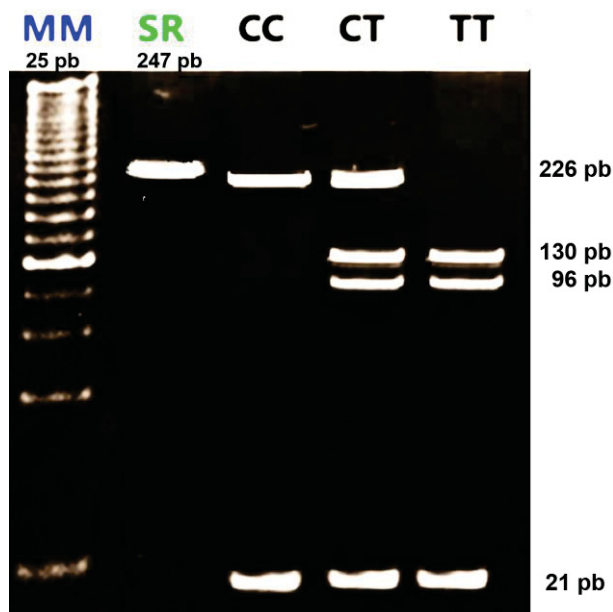


Mapa de restrição do produto de PCR (247 pb) do gene *CTLA-4*. A seta indica o sítio de restrição para a enzima *Mse I*. O "X" em preto simula a ausência do sítio de restrição no alelo selvagem -138C. Na presença do alelo C, não há o reconhecimento da enzima por dois sítios de restrição para que ocorra a clivagem, havendo apenas um sítio de restrição gerando os fragmentos com 226 pb e 21 pb. Na presença do alelo T há o reconhecimento da enzima por dois sítios de restrição, sendo possível visualizar os fragmentos de 130 pb, 96 pb e 21 pb. O indivíduo homocigoto dominante CC apresenta dois fragmentos de 226 pb e 21 pb gerados pela PCR- RFLP; o heterocigoto CT apresenta 4 fragmentos (226 pb, 130 pb, 96 pb, e 21 pb); e o homocigoto de menor frequência TT apresenta 3 fragmentos (130 pb, 96 pb e 21 pb).

Fonte: O autor (2018).

A genotipagem dos indivíduos foi feita conforme o perfil de restrição, onde o homocigoto CC apresenta os fragmentos de 226 pb e 21 pb; o heterocigoto CT os fragmentos de 226 pb, 130 pb, 96 pb e 21 pb e o homocigoto TT os fragmentos de 130 pb, 96 pb e 21 pb (Figuras 8 e 9).

FIGURA 9. PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs5742909 DO GENE *CTLA-4*.



Eletroforese em gel de acrilamida 15% (TBE 1X) dos fragmentos de restrição com a enzima *Mse* I. MM: marcador de massa molecular de 25 pares de base (pb); SR: amostra sem corte; Genótipos CC (homozigoto), CT (heterozigoto), TT (homozigoto de menor frequência). Ao lado direito do gel a massa molecular esperada para os fragmentos de restrição. Fonte: O autor (2018).

As frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo -318C/T (rs5742909) do gene *CTLA-4* nos grupos estudados estão representados na Tabela 5. Não houve diferença significativa entre as frequências genótípicas ($P=0,241$) e alélica ($P=0,090$), sugerindo que o polimorfismo 5742909 do gene *CTLA-4* não está associado ao DM1 na população Sul-Brasileira.

A presença do alelo T pode contribuir para o aumento da expressão de *CTLA-4* e, conseqüentemente, para a inibição da atividade imunológica excessiva, reduzindo assim o risco de doenças autoimunes (WANG, X. B.; KAKOULIDOU, M.; *et al.*, 2002). Os homozigotos TT são raros entre as populações. Mesmo no genótipo CT, a atividade do promotor pode ser suficiente para produzir maior expressão de *CTLA-4* e, subseqüentemente, maior inibição da atividade das células linfocitárias T (BARRETT *et al.*, 2005; GUZMAN *et al.*, 2005). No estudo de Wang e colaboradores (2002), o alelo de menor frequência T mostrou-se associado a uma atividade promotora aumentada *in vitro* e *in vivo*.

Em 2001, Lee e colaboradores analisaram crianças Chinesas com DM1 e seus irmãos saudáveis, onde o alelo de menor frequência T foi capaz de neutralizar o efeito do alelo C, uma vez que o genótipo C/T também conferiu proteção. Este

estudo também sugere que o polimorfismo CT do nucleotídeo -318 poderia ser um bom marcador para avaliar a associação do gene *CTLA-4* com o DM1.

TABELA 5 - FREQUENCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs5742909 DO GENE *CTLA-4* NAS AMOSTRAS EM ESTUDO.

Polimorfismo		Controle (n= 150)	DM1 (n= 143)	P
(rs5742909) C>T CTLA-4	C/C	134 (89,3 %)	135 (94,4 %)	0,241*
	C/T	15 (10,0 %)	8 (5,6 %)	
	T/T	1 (0,6 %)	0 (0 %)	
Frequência do Alelo [95% IC]	T	5,7 [3,0 - 8,0]	2,8 [1,0 - 5,0]	0,090*
Dominante	CC/CT+TT	134/16	135/8	0,102
Recessivo	CC+TT/TT	149/1	143/0	0,981**

Valores dos genótipos são n (%); 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P*, probabilidade, teste de χ^2 . P**, probabilidade, teste de χ^2 corrigido por Yates. Frequências genotípicas de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2) para o polimorfismo rs5742909 no grupo controle (P=0,428) e no DM1 (P=0,730).

Fonte: O autor (2018).

O polimorfismo -318C/T foi significativamente associado ao DM1 em jovens Norte Americanos (STECK *et al.*, 2005), mas não conferiu presença de autoanticorpos de ilhotas (GAD) em níveis persistentes; sugerindo que este polimorfismo seja importante apenas nos estágios finais de desenvolvimento da doença. Não confere risco absoluto ao DM1.

O alelo -318T e genótipo CT/TT foram associados ao risco para o DM1 em uma população Tunisiana (BENMANSOUR *et al.*, 2010) e Americana, respectivamente. Ainda que não tenha sido verificado a associação do rs5742909 com DM1 na população Indiana (BANIASADI *et al.*, 2006) e Marroquina (BOUQBIS *et al.*, 2003), foi verificado que a frequência de indivíduos com genótipos C/T ou T/T foi significativamente maior no grupo de pacientes DM1 quando comparado com o grupo controle saudável. Sugere-se que na presença do alelo T nos pacientes DM1 pode ter atenuado a ação causada pela presença do alelo de risco C. No presente estudo, e em concordância com as frequências descritas nas populações Japonesa (IHARA *et al.*, 2001), da Estônia (KISAND; UIBO, 2012), Coreana (JUNG *et al.*, 2009), Argentina (CAPUTO *et al.*, 2007) e Chilena (BALIC *et al.*, 2009) a distribuição dos genótipos CT e TT foi similar entre os grupos controle e DM1 (Tabela 6).

Anjos e colaboradores (2004) verificaram associação polimórfica conjunta entre os polimorfismos -318C/T e +6230A/G. Através de um estudo realizado com pacientes DM1 na população Canadense, nenhum dos dois polimorfismos mostrou-se responsável pelo efeito funcional, embora o polimorfismo -318C/T tenha apresentado um possível mecanismo subjacente na região promotora do gene *CTLA-4* (ANJOS, S. M.; TESSIER; POLYCHRONAKOS, 2004). Baniyadi e colaboradores (2006) observaram uma possível associação entre DM1 e os polimorfismos -318C/T e -1661A/G da região promotora do gene *CTLA-4* em diferentes populações. O forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos na região 2q33 do gene *CTLA-4* torna difícil determinar quais alelos ou combinações de alelos são diretamente responsáveis pelas associações observadas (DOUROUDIS *et al.*, 2009).

Na população Caucasiana, não foi encontrado uma associação eficiente entre o polimorfismo rs5742909 do gene do *CTLA-4* e o DM1 (HEWARD *et al.*, 1998). Seria de esperar uma frequência mais elevada do alelo T do gene *CTLA-4*, pois este está associado a uma atividade promotora mais elevada (WANG, X. B.; KAKOULIDOU, M.; *et al.*, 2002). Mas a ausência do genótipo não é de fato surpreendente, uma vez que as frequências genotípicas em muitas populações não são significativamente diferentes de zero (GONZALEZ-ESCRIBANO *et al.*, 1999).

A Tabela 6 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas deste estudo para o polimorfismo rs5742909 do gene *CTLA-4* com outras populações analisadas na literatura. O alelo de menor frequência T está presente em baixa frequência em Norte-Africanos (2%), se comparado com populações Europeias (8-10%) (HARBO *et al.*, 1999; BOUQBIS *et al.*, 2003). Em contraste, a população Chinesa apresenta as frequências mais altas (18%) do alelo T (HEWARD *et al.*, 1998; BOUQBIS *et al.*, 2003). No entanto, o alelo -318T na região promotora do gene *CTLA-4* não tem demonstrado uma diferença étnica marcante (HEWARD *et al.*, 1998).

A frequência do alelo T nos grupos controle e DM1 foram inferiores às descritas para outras populações Europeias e Asiáticas, mas similar à descrita para a população Brasileira da região Sudeste (GUZMAN *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011), e superior ao dos Africanos (Tabela 6).

TABELA 6 - POLIMORFISMO rs5742909 DO GENE CTLA-4 COM DADOS DA LITERATURA.

CTLA-4 rs5742909			Genótipo (%)			Alelo MAF (%)
Grupo étnico	Características	N	CC	CT	TT	T
Presente estudo	DM1	143	94,4	5,6	0	2,8
	Controle	150	89,3	10,0	0,6	5,7
Japoneses (KISAND; UIBO, 2012)	DM1	320	-	-	-	9,4
	Controle	400	-	-	-	10,7
Marroquinos - norte da África (BOUQBIS <i>et al.</i> , 2003)	DM1	118	90,0	10,0	0	5,0
	Controle	114	96,0	4,0	0	2,0
Indianos (BANIASADI <i>et al.</i> , 2006)	DM1	130	86,9	11,5	1,6	7,3
	Controle	180	94,5	5,5	0	2,8
Argentinos (CAPUTO <i>et al.</i> , 2007)	DM1	120	85,8	13,3	0,8	7,5
	Controle	136	80,9	19,1	0	9,6
Canadenses (QU <i>et al.</i> , 2009)	DM1	2298	-	-	-	9,0
	Controle	2027	-	-	-	-
Chilenos (BALIC <i>et al.</i> , 2009)	DM1	300	81,1	16,7	2,2	10,5
	Controle	310	81,6	15,1	3,2	10,8
Coreanos (JUNG <i>et al.</i> , 2009)	DM1	176	79,5	19,3	1,1	10,8
	Controle	90	78,9	18,9	2,2	11,7
Tunisianos (BENMANSOUR <i>et al.</i> , 2010)	DM1	228	69,7	22,8	7,5	18,4
	Controle	193	80,8	15,0	4,1	11,7
Brasileiros – Sudeste (GUZMAN <i>et al.</i> , 2005)	Branços	103	84,0	16,0	0	8,0
	Mulatos	97	88,0	12,0	0	6,0
	Negros	79	89,0	11,0	0	6,0
Brasileiros – Sudeste (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2011)	Saudáveis	217	88,0	11,0	1,0	7,0
Chineses - Taiwan (LEE <i>et al.</i> , 2001)	DM1	347	87,3	12,1	0,6	6,6
	Controle	260	77,3	21,5	1,2	11,9
Americanos (STECK <i>et al.</i> , 2005)	DM1	38	73,7		26,3	9,7
	Controle	76	90,8		9,2	11,2
Europeus	Saudáveis	18504	-	-	-	9,1
Asiáticos	Saudáveis	1618	-	-	-	10,6
Americanos	Saudáveis	838	-	-	-	7,0
Africanos (dbSNP, 2018)	Saudáveis	8736	-	-	-	1,8

Em negrito: dados obtidos neste estudo e as frequências do alelo menos frequente (T) que são similares ao Intervalo de Confiança (95%); DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1. MAF: alelo de menor frequência. -: dados não disponíveis. (dbSNP, 2018), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

Fonte: O autor (2018).

Em doenças complexas, uma grande maioria das variantes genéticas contribuem para a suscetibilidade de risco ou de proteção de determinada doença. Vários alelos contribuem com ações pequenas, mas importantes, no desenvolvimento da patologia. Por trata-se de pequenos efeitos genéticos, em combinação com fatores ambientais, muitas vezes a localização exata da ação dos polimorfismos causais que contribuem para uma resposta autoimune torna-se dificultada. Por esta razão, as doenças complexas de natureza multifatorial, necessitam de inúmeros estudos para delimitar a influência da heterogeneidade

genética com intuito de aumentar a probabilidade de encontrar os verdadeiros polimorfismo ligados aos agravos dos sintomas gerados nas diversas patogenias (THOMSON *et al.*, 1988; JULIER *et al.*, 1991).

Devemos considerar que a variante alélica do polimorfismo rs5742909 pode não ter um efeito direto na ativação de células linfocitárias T e no desenvolvimento de doenças autoimunes (CAPUTO *et al.*, 2007). Em vez disso, o alelo T pode ter um efeito funcional não relacionado à doença ou pode estar em forte desequilíbrio de ligação com outros alelos causadores da doença tendo assim sua ação sobreposta por outros polimorfismos (KISAND; UIBO, 2012).

Ainda que não possamos descartar a hipótese de que, aumentando a coorte amostral do nosso estudo, poderíamos detectar uma associação significativa deste polimorfismo -318C/T com o DM1, os achados são consistentes com estudos anteriores em que houve falta de associação com vários distúrbios autoimunes, incluindo doença autoimune da tireoide (HEWARD *et al.*, 1998), doença de Graves (HADJ KACEM *et al.*, 2001; UEDA *et al.*, 2003) e *Diabetes mellitus* tipo 1 (IHARA *et al.*, 2001; BOUQBIS *et al.*, 2003; BANIASADI *et al.*, 2006; CAPUTO *et al.*, 2007; BALIC *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2009; QU *et al.*, 2009; KISAND; UIBO, 2012; ALMASI *et al.*, 2015).

Bouqbis *et al.* (2003), reforçou a importância de se confirmar essa ausência de associação em diferentes populações, a fim de descrever os achados, independentemente do resultado genético das amostras analisadas.

Análises de variância (ANOVA) realizadas para este polimorfismo, na busca de associação dos genótipos com as concentrações séricas de biomarcadores clínicos nas amostras em estudo não revelaram nenhuma associação significativa.

O estudo do rs5742909 do gene *CTLA-4*, em população adulta Brasileira, em prévia definição inicial, não revela associação da frequência alélica e genotípica com o *Diabetes mellitus* tipo 1.

5. CONCLUSÕES

- Os polimorfismos rs231775 e rs5742909 do gene do antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (*CTLA-4*) não foram associados ao *Diabetes mellitus* tipo 1 ou aos biomarcadores em uma população Brasileira.

REFERÊNCIAS

ABRAMSON, J.; HUSEBYE, E. S. Autoimmune regulator and self-tolerance - molecular and clinical aspects. **Immunol Rev.** v. 271, n.1, p. 127-40. 2016.

ADA. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2016. **Diabetes Care.** v. 39 Suppl 1, p. S1-112. 2016.

ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. **Diabetes Care.** v. 42, n.Suppl 1, p. S13-S28. 2019a.

ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. **Diabetes Care.** v. v.42, p. p. S13-S28. 2019b.

ADA. Standards of Medical Care in Diabetes - 2019. **Diabetes Care.** v. 42, p. 204. 2019c.

AKBAS, E. M. *et al.* Association of uric acid, atherogenic index of plasma and albuminuria in diabetes mellitus. **Int J Clin Exp Med.** v. 7, n.12, p. 5737-43. 2014.

AL-JENAIDI, F. A. *et al.* Contribution of selective HLA-DRB1/DQB1 alleles and haplotypes to the genetic susceptibility of type 1 diabetes among Lebanese and Bahraini Arabs. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 90, n.9, p. 5104-9. 2005.

ALEGRE, M. L.; FRAUWIRTH, K. A.; THOMPSON, C. B. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. **Nat Rev Immunol.** v. 1, n.3, p. 220-8. 2001.

ALESSI, M. C.; WOJTA, J. Obesity and vascular disease: from bench to bedside. **Thromb Haemost.** v. 110, n.4, p. 632-3. 2013.

ALMASI, S. *et al.* Investigation of CTLA-4-318C/T gene polymorphism in cases with type 1 diabetes of Azerbaijan, Northwest Iran. **Immunol Lett.** v. 166, n.2, p. 134-9. 2015.

ALMASI, S. *et al.* Association of CTLA-4 gene promoter polymorphisms with systemic sclerosis in Iranian population. **Genes Immun.** v. 7, n.5, p. 401-6. 2006.

ALVES-SILVA, J. *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet.** v. 67, n.2, p. 444-61. 2000.

ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. **Annu Rev Immunol.** v. 23, p. 447-85. 2005.

ANDERSON, M. S.; SU, M. A. AIRE expands: new roles in immune tolerance and beyond. **Nat Rev Immunol.** v. 16, n.4, p. 247-58. 2016.

ANDERSON, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. **Science.** v. 298, n.5597, p. 1395-401. 2002.

ANDERSSON, K.; ARNER, P. Systemic nicotine stimulates human adipose tissue lipolysis through local cholinergic and catecholaminergic receptors. **Int J Obes Relat Metab Disord**. v. 25, n.8, p. 1225-32. 2001.

ANDRADE, C. S. *et al.* Factors associated with high levels of glycated haemoglobin in patients with type 1 diabetes: a multicentre study in Brazil. **BMJ Open**. v. 7, n.12, p. e018094. 2017.

ANDREEVSKII, T. V. *et al.* [Polymorphism A/G in position +49 of CTLA4 exon 1 in multiple sclerosis in Russians]. **Mol Biol (Mosk)**. v. 36, n.4, p. 643-8. 2002.

ANGEL, B. *et al.* Associations of the CTLA-4 polymorphisms with type 1 diabetes in a Chilean population: case-parent design. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 85, n.3, p. e34-6. 2009.

ANJOS, S. *et al.* A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. **J Biol Chem**. v. 277, n.48, p. 46478-86. 2002.

ANJOS, S. M.; TESSIER, M. C.; POLYCHRONAKOS, C. Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 89, n.12, p. 6257-65. 2004.

ANQUETIL, F. *et al.* Alpha cells, the main source of IL-1beta in human pancreas. **J Autoimmun**. v. 81, p. 68-73. 2017.

ARCANJO, C. L. *et al.* Avaliação de Dislipidemia e de Índices Antropométricos em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 49, n.6, p. 8. 2005.

ARICHA, R. *et al.* The susceptibility of Aire(-/-) mice to experimental myasthenia gravis involves alterations in regulatory T cells. **J Autoimmun**. v. 36, n.1, p. 16-24. 2011.

ARIF, S. *et al.* Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. **J Clin Invest**. v. 113, n.3, p. 451-63. 2004.

ARONOW, W. S. What should the blood pressure goal be in patients with hypertension who are at high risk for cardiovascular disease? **Hosp Pract (1995)**. v. 40, n.4, p. 28-32. 2012.

ATHYROS, V. G. *et al.* Diabetes and lipid metabolism. **Hormones (Athens)**. v. 17, n.1, p. 61-67. 2018.

ATKINSON, M. A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 2, n.11, p. 2012.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**. v. 383, n.9911, p. 69-82. 2014.

BACH, J. F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocr Rev.** v. 15, n.4, p. 516-42. 1994.

BADENHOOP, K. *et al.* Genetic susceptibility to type 1 diabetes: clinical and molecular heterogeneity of IDDM1 and IDDM2 in a German population. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.** v. 107 Suppl 3, p. S89-92. 1999.

BAILEY-BUCKTROUT, S. L.; BLUESTONE, J. A. Regulatory T cells: stability revisited. **Trends Immunol.** v. 32, n.7, p. 301-6. 2011.

BALBI, G. *et al.* Association of -318 C/T and +49 A/G cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms with a clinical subset of Italian patients with systemic sclerosis. **Clin Exp Immunol.** v. 149, n.1, p. 40-7. 2007.

BALIARSINGH, S.; SHARMA, N.; MUKHERJEE, R. Serum uric acid: marker for atherosclerosis as it is positively associated with "atherogenic index of plasma". **Arch Physiol Biochem.** v. 119, n.1, p. 27-31. 2013.

BALIC, I. *et al.* Association of CTLA-4 polymorphisms and clinical-immunologic characteristics at onset of type 1 diabetes mellitus in children. **Hum Immunol.** v. 70, n.2, p. 116-20. 2009.

BANACH, M. *et al.* Lipids, blood pressure and kidney update 2015. **Lipids Health Dis.** v. 14, p. 167. 2015.

BANIASADI, V. *et al.* Promoter region -318 C/ T and -1661 A/G CTLA-4 single nucleotide polymorphisms and type 1 diabetes in North Indians. **Tissue Antigens.** v. 67, n.5, p. 383-9. 2006.

BARRETT, J. C. *et al.* Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. **Nat Genet.** v. 41, n.6, p. 703-7. 2009.

BARRETT, J. C. *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics.** v. 21, n.2, p. 263-5. 2005.

BARROS, B. S. V. *et al.* Type 1 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: When Should We Be Concerned? A Nationwide Study in Brazil. **Nutrients.** v. 9, n.8, p. 2017.

BASIRATNIA, M. *et al.* Ambulatory blood pressure monitoring in children and adolescents with type-1 diabetes mellitus and its relation to diabetic control and microalbuminuria. v. 23, n.2, p. 311-315. 2012.

BEHRENS, T. W. Lyp breakdown and autoimmunity. **Nat Genet.** v. 43, n.9, p. 821-2. 2011.

BENMANSOUR, J. *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to autoimmune type 1 diabetes in Tunisians. **Clin Vaccine Immunol.** v. 17, n.9, p. 1473-7. 2010.

BENOWITZ, N. L.; BURBANK, A. D. Cardiovascular toxicity of nicotine: Implications for electronic cigarette use. **Trends Cardiovasc Med**. v. 26, n.6, p. 515-23. 2016.

BERGHOLDT, R. *et al.* CBLB variants in type 1 diabetes and their genetic interaction with CTLA4. **J Leukoc Biol**. v. 77, n.4, p. 579-85. 2005.

BJORNSTAD, P. *et al.* Plasma triglycerides predict incident albuminuria and progression of coronary artery calcification in adults with type 1 diabetes: the Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes Study. **J Clin Lipidol**. v. 8, n.6, p. 576-83. 2014.

BJORNSTAD, P. *et al.* Achieving International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes and American Diabetes Association clinical guidelines offers cardiorenal protection for youth with type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**. v. 16, n.1, p. 22-30. 2015.

BLOHME, G. *et al.* Male predominance of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in young adults: results from a 5-year prospective nationwide study of the 15-34-year age group in Sweden. **Diabetologia**. v. 35, n.1, p. 56-62. 1992.

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.

BONIFACIO, E. Predicting type 1 diabetes using biomarkers. **Diabetes Care**. v. 38, n.6, p. 989-96. 2015.

BORCHERS, A. T.; UIBO, R.; GERSHWIN, M. E. The geoepidemiology of type 1 diabetes. **Autoimmun Rev**. v. 9, n.5, p. A355-65. 2010.

BORG, H. *et al.* Evaluation of the new ADA and WHO criteria for classification of diabetes mellitus in young adult people (15-34 yrs) in the Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). **Diabetologia**. v. 46, n.2, p. 173-81. 2003.

BOTTINI, N. *et al.* A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. **Nat Genet**. v. 36, n.4, p. 337-8. 2004.

BOUMA, G. *et al.* NOD mice have a severely impaired ability to recruit leukocytes into sites of inflammation. **Eur J Immunol**. v. 35, n.1, p. 225-35. 2005.

BOUQBIS, L. *et al.* Association of the CTLA4 promoter region (-1661G allele) with type 1 diabetes in the South Moroccan population. **Genes Immun**. v. 4, n.2, p. 132-7. 2003.

BRAGA DE SOUZA, A. C. *et al.* Health-related quality of life in people with type 1 Diabetes Mellitus: data from the Brazilian Type 1 Diabetes Study Group. **Health Qual Life Outcomes**. v. 13, p. 204. 2015.

BRASÍLIA, D. Política nacional de alimentação e nutrição. v. p. 2011.

BRONSTEIN, H. D.; KANTROWITZ, P. A.; SCHAFFNER, F. Marked enlargement of the liver and transient ascites associated with the treatment of diabetic acidosis. **N Engl J Med**. v. 261, p. 1314-8. 1959.

BROPHY, K. *et al.* Haplotypes in the CTLA4 region are associated with coeliac disease in the Irish population. **Genes Immun**. v. 7, n.1, p. 19-26. 2006.

BROWNLEE, M.; HIRSCH, I. B. Glycemic variability: a hemoglobin A1c-independent risk factor for diabetic complications. **JAMA**. v. 295, n.14, p. 1707-8. 2006.

BRUNET, J. F. *et al.* A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. **Nature**. v. 328, n.6127, p. 267-70. 1987.

BRUNKOW, M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nat Genet**. v. 27, n.1, p. 68-73. 2001.

BRUSKO, T. *et al.* No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 56, n.3, p. 604-12. 2007.

BRUSKO, T. M. *et al.* Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 54, n.5, p. 1407-14. 2005.

BULUM, T. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease markers are associated with insulin resistance in type 1 diabetes. **Dig Dis Sci**. v. 56, n.12, p. 3655-63. 2011.

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.

CALCATERRA, V. *et al.* Smoke exposure and cardio-metabolic profile in youth with type 1 diabetes. **Diabetol Metab Syndr**. v. 10, p. 53. 2018.

CAPUTO, M. *et al.* Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 heterozygous codon 49 A/G dimorphism is associated to latent autoimmune diabetes in adults (LADA). **Autoimmunity**. v. 38, n.4, p. 277-81. 2005.

CAPUTO, M. *et al.* No evidence of association of CTLA-4 -318 C/T, 159 C/T, 3' STR and SUMO4 163 AG polymorphism with autoimmune diabetes. **Immunol Invest**. v. 36, n.3, p. 259-70. 2007.

CARDOZO, A. K. *et al.* IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. **Diabetologia**. v. 46, n.2, p. 255-66. 2003.

CARNEIRO, J. R. I. *et al.* Obesidade na adolescência: fator de risco para complicações clínico-metabólicas %J Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. v. 44, p. 390-396. 2000.

CARRENO, B. M. *et al.* CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. **J Immunol.** v. 165, n.3, p. 1352-6. 2000.

CENA, H.; FONTE, M. L.; TURCONI, G. Relationship between smoking and metabolic syndrome. **Nutr Rev.** v. 69, n.12, p. 745-53. 2011.

CERNEA, S.; DOBREANU, M.; RAZ, I. Prevention of type 1 diabetes: today and tomorrow. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 26, n.8, p. 602-5. 2010.

CHEN, W.; JIN, W.; WAHL, S. M. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. **J Exp Med.** v. 188, n.10, p. 1849-57. 1998.

CHIKUMA, S.; IMBODEN, J. B.; BLUESTONE, J. A. Negative regulation of T cell receptor-lipid raft interaction by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **J Exp Med.** v. 197, n.1, p. 129-35. 2003.

CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS, C. *et al.* Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. **Lancet.** v. 371, n.9607, p. 117-25. 2008.

CHRISTIANSON, S. W.; SHULTZ, L. D.; LEITER, E. H. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. **Diabetes.** v. 42, n.1, p. 44-55. 1993.

CHUANG, E. *et al.* The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. **Immunity.** v. 13, n.3, p. 313-22. 2000.

CIRILLO, M. Evaluation of glomerular filtration rate and of albuminuria/proteinuria. **J Nephrol.** v. 23, n.2, p. 125-32. 2010.

CITRO, A.; CANTARELLI, E.; PIEMONTE, L. The CXCR1/2 Pathway: Involvement in Diabetes Pathophysiology and Potential Target for T1D Interventions. **Curr Diab Rep.** v. 15, n.10, p. 68. 2015.

CLARK, M.; KROGER, C. J.; TISCH, R. M. Type 1 Diabetes: A Chronic Anti-Self-Inflammatory Response. **Front Immunol.** v. 8, p. 1898. 2017.

CNOP, M. *et al.* Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes.** v. 54 Suppl 2, p. S97-107. 2005.

COLLADO-MESA, F. *et al.* Prevalence and management of hypertension in type 1 diabetes mellitus in Europe: the EURODIAB IDDM Complications Study. **Diabet Med.** v. 16, n.1, p. 41-8. 1999.

COLLINS, A. V. *et al.* The interaction properties of costimulatory molecules revisited. **Immunity.** v. 17, n.2, p. 201-10. 2002.

COLLISON, L. W. *et al.* IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. **Nat Immunol.** v. 11, n.12, p. 1093-101. 2010.

CONCANNON, P. *et al.* Genome-wide scan for linkage to type 1 diabetes in 2,496 multiplex families from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. **Diabetes.** v. 58, n.4, p. 1018-22. 2009.

CONCANNON, P. *et al.* Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. **Diabetes.** v. 54, n.10, p. 2995-3001. 2005.

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.

CONEN, D. *et al.* Prevalence of hyperuricemia and relation of serum uric acid with cardiovascular risk factors in a developing country. **BMC Public Health.** v. 4, p. 9. 2004.

COPPIETERS, K. T. *et al.* Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. **J Exp Med.** v. 209, n.1, p. 51-60. 2012.

CORBIN, K. D. *et al.* Obesity in Type 1 Diabetes: Pathophysiology, Clinical Impact, and Mechanisms. **Endocr Rev.** v. 39, n.5, p. 629-663. 2018.

COUTINHO, W. F.; SILVA JUNIOR, W. S. Diabetes Care in Brazil. **Ann Glob Health.** v. 81, n.6, p. 735-41. 2015.

COX, N. J. *et al.* Seven regions of the genome show evidence of linkage to type 1 diabetes in a consensus analysis of 767 multiplex families. **Am J Hum Genet.** v. 69, n.4, p. 820-30. 2001.

D'ALISE, A. M. *et al.* The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 105, n.50, p. 19857-62. 2008.

DABELEA, D. *et al.* Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. **JAMA.** v. 311, n.17, p. 1778-86. 2014.

DABELEA, D. *et al.* Trends in the prevalence of ketoacidosis at diabetes diagnosis: the SEARCH for diabetes in youth study. **Pediatrics.** v. 133, n.4, p. e938-45. 2014.

DALLA-COSTA, R. *et al.* Polymorphisms in the 2q33 and 3q21 chromosome regions including T-cell coreceptor and ligand genes may influence susceptibility to pemphigus foliaceus. **Hum Immunol.** v. 71, n.8, p. 809-17. 2010.

DARIAVACH, P. *et al.* Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. **Eur J Immunol.** v. 18, n.12, p. 1901-5. 1988.

DARLINGTON, P. J. *et al.* Hierarchical regulation of CTLA-4 dimer-based lattice formation and its biological relevance for T cell inactivation. **J Immunol.** v. 175, n.2, p. 996-1004. 2005.

DAVIES, J. L. *et al.* A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. **Nature.** v. 371, n.6493, p. 130-6. 1994.

DE FEO, P.; GAISANO, M. G.; HAYMOND, M. W. Differential effects of insulin deficiency on albumin and fibrinogen synthesis in humans. **J Clin Invest.** v. 88, n.3, p. 833-40. 1991.

DE GOFFAU, M. C. *et al.* Fecal microbiota composition differs between children with beta-cell autoimmunity and those without. **Diabetes.** v. 62, n.4, p. 1238-44. 2013.

DEEDWANIA, P. C. Blood pressure control in diabetes mellitus: is lower always better, and how low should it go? **Circulation.** v. 123, n.24, p. 2776-8. 2011.

DEICHMANN, K. *et al.* An Mse I RFLP in the human CTLA4 promotor. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 225, n.3, p. 817-8. 1996.

DELONG, T. *et al.* Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion. **Science.** v. 351, n.6274, p. 711-4. 2016.

DERBINSKI, J. *et al.* Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. **Nat Immunol.** v. 2, n.11, p. 1032-9. 2001.

DEVARAJU, P. *et al.* The CTLA4 +49 A/G (rs231775) polymorphism influences susceptibility to SLE in South Indian Tamils. **Tissue Antigens.** v. 83, n.6, p. 418-21. 2014.

DIANA, J.; LEHUEN, A. Macrophages and beta-cells are responsible for CXCR2-mediated neutrophil infiltration of the pancreas during autoimmune diabetes. **EMBO Mol Med.** v. 6, n.8, p. 1090-104. 2014.

DIAZ-VALENCIA, P. A.; BOUGNERES, P.; VALLERON, A. J. Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review. **BMC Public Health.** v. 15, p. 255. 2015.

DOMINGUETI, C. P. *et al.* Association of different biomarkers of renal function with D-dimer levels in patients with type 1 diabetes mellitus (renal biomarkers and D-dimer in diabetes). **Arch Endocrinol Metab.** v. 62, n.1, p. 27-33. 2018.

DONAGHUE, K. C. *et al.* Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. **Pediatr Diabetes.** v. 10 Suppl 12, p. 195-203. 2009.

DOOLEY, J. *et al.* Genetic predisposition for beta cell fragility underlies type 1 and type 2 diabetes. **Nat Genet.** v. 48, n.5, p. 519-27. 2016.

DOTTA, F. *et al.* Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 104, n.12, p. 5115-20. 2007.

DOUROUDIS, K. *et al.* Association of CTLA4 but not ICOS polymorphisms with type 1 diabetes in two populations with different disease rates. **Hum Immunol.** v. 70, n.7, p. 536-9. 2009.

DU TOIT, G. *et al.* Randomized trial of peanut consumption in infants at risk for peanut allergy. **N Engl J Med.** v. 372, n.9, p. 803-13. 2015.

DUCA, L.; SIPPL, R.; SNELL-BERGEON, J. K. Is the risk and nature of CVD the same in type 1 and type 2 diabetes? **Curr Diab Rep.** v. 13, n.3, p. 350-61. 2013.

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.

DUVNJAK, L.; BLASLOV, K. Statin treatment is associated with insulin sensitivity decrease in type 1 diabetes mellitus: A prospective, observational 56-month follow-up study. **J Clin Lipidol.** v. 10, n.4, p. 1004-1010. 2016.

EI WAFAI, R. J. *et al.* Association of HLA class II alleles and CTLA-4 polymorphism with type 1 diabetes. **Saudi J Kidney Dis Transpl.** v. 22, n.2, p. 273-81. 2011.

EIDAM, R. O PROCESSO PEDAG? GICO E A FORMA?? O DO IMIGRANTE ALEM? O NAS COL? NIAS DE BOM JARDIM DO SUL E WITMARSUM (PARAN?). v. p. 2009.

EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: molecular, cellular and clinical immunology. **Adv Exp Med Biol.** v. 552, p. 306-10. 2004.

EIZIRIK, D. L. *et al.* The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. **PLoS Genet.** v. 8, n.3, p. e1002552. 2012.

ENDESFELDER, D. *et al.* Compromised gut microbiota networks in children with anti-islet cell autoimmunity. **Diabetes.** v. 63, n.6, p. 2006-14. 2014.

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.

FALLARINO, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. **Nat Immunol.** v. 4, n.12, p. 1206-12. 2003.

FALUDI, A. A. *et al.* Atualização da diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose 2017. **Arq Bras Cardiol.** v. 109, n.2, p. 76. 2017.

FERNANDEZ-RAMOS, C. *et al.* Incidence of childhood-onset type 1 diabetes in Biscay, Spain, 1990-2013. **Pediatr Diabetes**. v. 18, n.1, p. 71-76. 2017.

FERNQVIST, E.; GUNNARSSON, R.; LINDE, B. Influence of circulating epinephrine on absorption of subcutaneously injected insulin. **Diabetes**. v. 37, n.6, p. 694-701. 1988.

FERRARO, A. *et al.* Expansion of Th17 cells and functional defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 60, n.11, p. 2903-13. 2011.

FERREIRA-HERMOSILLO, A.; MOLINA-AYALA, M. A. [Autoimmune diseases in type 1A diabetes mellitus]. **Rev Med Chil**. v. 143, n.8, p. 1042-9. 2015.

FERREIRA, A. C. *et al.* Type 1 diabetes susceptibility determined by HLA alleles and CTLA-4 and insulin genes polymorphisms in Brazilians. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 53, n.3, p. 368-73. 2009.

FIELD, L. L. *et al.* Evidence for a locus (IDDM16) in the immunoglobulin heavy chain region on chromosome 14q32.3 producing susceptibility to type 1 diabetes. **Genes Immun**. v. 3, n.6, p. 338-44. 2002.

FIFE, B. T.; BLUESTONE, J. A. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. **Immunol Rev**. v. 224, p. 166-82. 2008.

FILIPPI, C. M.; VON HERRATH, M. G. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. **Diabetes**. v. 57, n.11, p. 2863-71. 2008.

FINEGOOD, D. T.; SCAGLIA, L.; BONNER-WEIR, S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. **Diabetes**. v. 44, n.3, p. 249-56. 1995.

FINNISH-GERMAN, A. C. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. **Nat Genet**. v. 17, n.4, p. 399-403. 1997.

FLAIM, K. E. *et al.* Direct effect of insulin on albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. **Am J Physiol**. v. 249, n.5 Pt 1, p. E447-53. 1985.

FLOR, L. S.; CAMPOS, M. R. J. R. B. D. E. The prevalence of diabetes mellitus and its associated factors in the Brazilian adult population: evidence from a population-based survey. v. 20, n.1, p. 16-29. 2017.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nat Immunol**. v. 4, n.4, p. 330-6. 2003.

FOUSTERI, G.; LIOSSIS, S. N.; BATTAGLIA, M. Roles of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 in immunity and autoimmunity. **Clin Immunol.** v. 149, n.3, p. 556-65. 2013.

GAGNERAULT, M. C. *et al.* Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. **J Exp Med.** v. 196, n.3, p. 369-77. 2002.

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.

GAO, D. N.; YANG, Z. X.; QI, Q. H. Roles of PD-1, Tim-3 and CTLA-4 in immunoregulation in regulatory T cells among patients with sepsis. **Int J Clin Exp Med.** v. 8, n.10, p. 18998-9005. 2015.

GARCIA-TOUZA, M.; SOWERS, J. R. Evidence-based hypertension treatment in patients with diabetes. **J Clin Hypertens (Greenwich).** v. 14, n.2, p. 97-102. 2012.

GARG, G. *et al.* Type 1 diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4+CD25+ regulatory T cell function. **J Immunol.** v. 188, n.9, p. 4644-53. 2012.

GAUD, G.; LESOURNE, R.; LOVE, P. E. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. **Nat Rev Immunol.** v. 18, n.8, p. 485-497. 2018.

GERBER, P. A. *et al.* Smoking is associated with impaired long-term glucose metabolism in patients with type 1 diabetes mellitus. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** v. 23, n.2, p. 102-8. 2013.

GILLESPIE, K. M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **CMAJ.** v. 175, n.2, p. 165-70. 2006.

GIORELLI, M. *et al.* IFN-beta1a modulates the expression of CTLA-4 and CD28 splice variants in human mononuclear cells: induction of soluble isoforms. **J Interferon Cytokine Res.** v. 21, n.10, p. 809-12. 2001.

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

GOMES, M. B. *et al.* Regional differences in clinical care among patients with type 1 diabetes in Brazil: Brazilian Type 1 Diabetes Study Group. **Diabetol Metab Syndr.** v. 4, n.1, p. 44. 2012.

GOMES, M. B. *et al.* Self-reported color-race and genomic ancestry in an admixed population: A contribution of a nationwide survey in patients with type 1 diabetes in Brazil. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 140, p. 245-252. 2018.

GOMES, M. B. *et al.* Prevalence, awareness, and treatment of hypertension in patients with type 1 diabetes: a nationwide multicenter study in Brazil. **Int J Hypertens.** v. 2013, p. 565263. 2013.

GONI, M. J. *et al.* Incidence and Risk Factors Involved in the Development of Nephropathy in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus: Follow Up Since Onset. **Can J Diabetes**. v. 40, n.3, p. 258-63. 2016.

GONZALEZ-ESCRIBANO, M. F. *et al.* CTLA4 polymorphisms in Spanish patients with rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**. v. 53, n.3, p. 296-300. 1999.

GOODMAN, J. I. HEPATOMEGALY AND DIABETES MELLITUS. **Annals of Internal Medicine**. v. v. 39, p. p. 1077-1087. 1953.

GOTTUMUKKALA, R. V. *et al.* Myocardial infarction triggers chronic cardiac autoimmunity in type 1 diabetes. **Sci Transl Med**. v. 4, n.138, p. 138ra80. 2012.

GRINBERG-BLEYER, Y. *et al.* IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. **J Exp Med**. v. 207, n.9, p. 1871-8. 2010.

GROHMANN, U. *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. **Nat Immunol**. v. 3, n.11, p. 1097-101. 2002.

GROUP, D. P. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. **Diabet Med**. v. 23, n.8, p. 857-66. 2006.

GRUNDY, S. M. *et al.* Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. **Circulation**. v. 110, n.2, p. 227-39. 2004.

GUAN, R. *et al.* Chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) in sera of patients with type 1 diabetes and diabetic complications. **PLoS One**. v. 6, n.4, p. e17822. 2011.

GUELHO, D.; PAIVA, I.; CARVALHEIRO, M. J. R. P. D. E., DIABETES E METABOLISMO. Diabetes mellitus–um «continuum» fisiopatológico. v. 8, n.1, p. 44-49. 2013.

GUERAU-DE-ARELLANO, M. *et al.* Neonatal tolerance revisited: a perinatal window for Aire control of autoimmunity. **J Exp Med**. v. 206, n.6, p. 1245-52. 2009.

GUZMAN, V. B. *et al.* Characterization of CD28, CTLA4, and ICOS polymorphisms in three Brazilian ethnic groups. **Hum Immunol**. v. 66, n.7, p. 773-6. 2005.

HADJ KACEM, H. *et al.* CTLA-4 gene polymorphisms in Tunisian patients with Graves' disease. **Clin Immunol**. v. 101, n.3, p. 361-5. 2001.

HAFFNER, S. M.; AMERICAN DIABETES, A. Management of dyslipidemia in adults with diabetes. **Diabetes Care**. v. 26 Suppl 1, p. S83-6. 2003.

HALLER, K. *et al.* Type 1 diabetes is insulin -2221 MspI and CTLA-4 +49 A/G polymorphism dependent. **Eur J Clin Invest**. v. 34, n.8, p. 543-8. 2004.

HALLER, K. *et al.* Insulin gene VNTR, CTLA-4 +49A/G and HLA-DQB1 alleles distinguish latent autoimmune diabetes in adults from type 1 diabetes and from type 2 diabetes group. **Tissue Antigens**. v. 69, n.2, p. 121-7. 2007.

HANEFELD, M. *et al.* Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. **Diabetologia**. v. 39, n.12, p. 1577-83. 1996.

HARBO, H. F. *et al.* CTLA4 promoter and exon 1 dimorphisms in multiple sclerosis. **Tissue Antigens**. v. 53, n.1, p. 106-10. 1999.

HARRISON, L. C. Risk assessment, prediction and prevention of type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**. v. 2, n.2, p. 71-82. 2001.

HARTEMANN, A. *et al.* Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet Diabetes Endocrinol**. v. 1, n.4, p. 295-305. 2013.

HASEDA, F. *et al.* CD4(+) CD45RA(-) FoxP3high activated regulatory T cells are functionally impaired and related to residual insulin-secreting capacity in patients with type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol**. v. 173, n.2, p. 207-16. 2013.

HAUACHE, O. M. *et al.* Estimation of diabetes risk in Brazilian population by typing for polymorphisms in HLA-DR-DQ, INS and CTLA-4 genes. **Dis Markers**. v. 21, n.3, p. 139-45. 2005.

HE, Q. *et al.* Thymic development of autoreactive T cells in NOD mice is regulated in an age-dependent manner. **J Immunol**. v. 191, n.12, p. 5858-66. 2013.

HEGEL, J. K. *et al.* CD152 (CTLA-4) regulates effector functions of CD8+ T lymphocytes by repressing Eomesodermin. **Eur J Immunol**. v. 39, n.3, p. 883-93. 2009.

HELVE, J. *et al.* Biochemical variables and survival of patients with type 1 diabetes on renal replacement therapy. **Blood Purif**. v. 38, n.1, p. 18-23. 2014.

HEROLD, K. C. *et al.* Validity and reproducibility of measurement of islet autoreactivity by T-cell assays in subjects with early type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 58, n.11, p. 2588-95. 2009.

HEWARD, J. M. *et al.* No evidence for allelic association of a human CTLA-4 promoter polymorphism with autoimmune thyroid disease in either population-based case-control or family-based studies. **Clin Endocrinol (Oxf)**. v. 49, n.3, p. 331-4. 1998.

HIGGINS, J. P.; THOMPSON, S. G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. **Stat Med**. v. 21, n.11, p. 1539-58. 2002.

HIRAI, F. E. *et al.* Severe hypoglycemia and smoking in a long-term type 1 diabetic population: Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. **Diabetes Care**. v. 30, n.6, p. 1437-41. 2007.

HOMANN, D. Back From the Brink: The Uses of Targeting the CXCL10: CXCR3 Axis in Type 1 Diabetes. **Diabetes**. v. 64, n.12, p. 3990-2. 2015.

HUANG, Q. *et al.* Association of the serum uric acid level with liver histology in biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease. **Biomed Rep**. v. 5, n.2, p. 188-192. 2016.

HUBER, A. *et al.* Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. **Endocr Rev**. v. 29, n.6, p. 697-725. 2008.

HULME, M. A. *et al.* Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 61, n.1, p. 14-22. 2012.

HUNT, K. A. *et al.* A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. **Eur J Hum Genet**. v. 13, n.4, p. 440-4. 2005.

HUTSON, S. M. *et al.* Regulation of albumin synthesis by hormones and amino acids in primary cultures of rat hepatocytes. **Am J Physiol**. v. 252, n.3 Pt 1, p. E291-8. 1987.

HUURMAN, V. A. *et al.* Differential inhibition of autoreactive memory- and alloreactive naive T cell responses by soluble cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (sCTLA4), CTLA4Ig and LEA29Y. **Clin Exp Immunol**. v. 150, n.3, p. 487-93. 2007.

IDF. IDF DIABETES ATLAS. **International Diabetes Federation**. v. p. 2017a.

IDF. **International Diabetes Federation, 2017, 7^aed.** Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 08 jan 2018.

IHARA, K. *et al.* Association studies of CTLA-4, CD28, and ICOS gene polymorphisms with type 1 diabetes in the Japanese population. **Immunogenetics**. v. 53, n.6, p. 447-54. 2001.

IKEGAMI, H. *et al.* The association of CTLA4 polymorphism with type 1 diabetes is concentrated in patients complicated with autoimmune thyroid disease: a multicenter collaborative study in Japan. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 91, n.3, p. 1087-92. 2006.

IN'T VELD, P. Insulinitis in human type 1 diabetes: The quest for an elusive lesion. **Islets**. v. 3, n.4, p. 131-8. 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.

INVITTI, C. *et al.* Prevalence and concomitants of glucose intolerance in European obese children and adolescents. **Diabetes Care**. v. 26, n.1, p. 118-24. 2003.

IPARDES. Caderno Estatístico Estado do Paraná. **INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL**. v. p. 14. 2018.

ISHIZAKA, N. *et al.* Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid atherosclerosis in Japanese individuals. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 25, n.5, p. 1038-44. 2005.

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.

JEFFERSON, L. S. *et al.* Diabetes-induced alterations in liver protein synthesis. Changes in the relative abundance of mRNAs for albumin and other plasma proteins. **J Biol Chem**. v. 258, n.2, p. 1369-75. 1983.

JENSEN, M. T. *et al.* Statins are independently associated with increased HbA1c in type 1 diabetes--The Thousand & 1 Study. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 111, p. 51-7. 2016.

Jl, J. *et al.* Ethnic differences in incidence of type 1 diabetes among second-generation immigrants and adoptees from abroad. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 95, n.2, p. 847-50. 2010.

JIN, P. *et al.* The association of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 + 49A/G and CT60 polymorphisms with type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in Chinese adults. **J Endocrinol Invest**. v. 38, n.2, p. 149-54. 2015.

JIN, P. *et al.* [Association of CTLA-4 + 49A/G and CT60 gene polymorphism with type 1 diabetes and thyroid autoimmunity]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. v. 89, n.18, p. 1246-9. 2009.

JOHNSON, R. J. *et al.* Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. **Diabetes**. v. 62, n.10, p. 3307-15. 2013.

JULIER, C. *et al.* Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. **Nature**. v. 354, n.6349, p. 155-9. 1991.

JUNG, M. H. *et al.* Association of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms and HLA class II alleles with the development of type 1 diabetes in Korean children and adolescents. **J Korean Med Sci**. v. 24, n.6, p. 1004-9. 2009.

KAR, D. *et al.* Relationship of cardiometabolic parameters in non-smokers, current smokers, and quitters in diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Cardiovasc Diabetol**. v. 15, n.1, p. 158. 2016.

KARVONEN, M. *et al.* Sex difference in the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus: an analysis of the recent epidemiological data. World Health Organization DIAMOND Project Group. **Diabetes Metab Rev.** v. 13, n.4, p. 275-91. 1997.

KATSAROU, A. *et al.* Type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Dis Primers.** v. 3, p. 17016. 2017.

KAVVOURA, F. K.; IOANNIDIS, J. P. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. **Am J Epidemiol.** v. 162, n.1, p. 3-16. 2005.

KAWASAKI, E. *et al.* Differences in the contribution of the CTLA4 gene to susceptibility to fulminant and type 1A diabetes in Japanese patients. **Diabetes Care.** v. 31, n.8, p. 1608-10. 2008.

KELLY, M. A. *et al.* Molecular aspects of type 1 diabetes. **Mol Pathol.** v. 56, n.1, p. 1-10. 2003.

KHODAEIAN, M. *et al.* Association between Genetic Variants and Diabetes Mellitus in Iranian Populations: A Systematic Review of Observational Studies. **J Diabetes Res.** v. 2015, p. 585917. 2015.

KHOSHROO, M. *et al.* The Relationship between insulin variable number of tandem repeats (INS-VNTR) -23 A/T and cytotoxic T lymphocyte associated protein-4 (CTLA-4) +49 A/G polymorphisms with islet autoantibodies in persons with diabetes. **Med J Islam Repub Iran.** v. 31, p. 83. 2017.

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

KIMBALL, S. R.; HORETSKY, R. L.; JEFFERSON, L. S. Hormonal regulation of albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. **Am J Physiol.** v. 268, n.1 Pt 1, p. E6-14. 1995.

KISAND, K.; UIBO, R. LADA and T1D in Estonian population - two different genetic risk profiles. **Gene.** v. 497, n.2, p. 285-91. 2012.

KISHIMOTO, H.; SPRENT, J. A defect in central tolerance in NOD mice. **Nat Immunol.** v. 2, n.11, p. 1025-31. 2001.

KLEIN, L. *et al.* Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). **Nat Rev Immunol.** v. 14, n.6, p. 377-91. 2014.

KNIP, M. *et al.* Hydrolyzed infant formula and early beta-cell autoimmunity: a randomized clinical trial. **JAMA.** v. 311, n.22, p. 2279-87. 2014.

KNIP, M.; SILJANDER, H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol.** v. 12, n.3, p. 154-67. 2016.

KOSMACZEWSKA, A. *et al.* Expression and functional significance of CTLA-4, a negative regulator of T cell activation. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. v. 49, n.1, p. 39-46. 2001.

KOSTIC, A. D. *et al.* The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression toward type 1 diabetes. **Cell Host Microbe**. v. 17, n.2, p. 260-73. 2015.

KOUKI, T. *et al.* CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. **J Immunol**. v. 165, n.11, p. 6606-11. 2000.

KRACHT, M. J. *et al.* Autoimmunity against a defective ribosomal insulin gene product in type 1 diabetes. **Nat Med**. v. 23, n.4, p. 501-507. 2017.

KRIEGEL, M. A.; RATHINAM, C.; FLAVELL, R. A. Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c+ CD11b+ dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 109, n.9, p. 3457-62. 2012.

KROGER, C. J.; WANG, B.; TISCH, R. Temporal increase in thymocyte negative selection parallels enhanced thymic SIRPalpha(+) DC function. **Eur J Immunol**. v. 46, n.10, p. 2352-2362. 2016.

KROGVOLD, L. *et al.* Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 64, n.5, p. 1682-7. 2015.

KROLEWSKI, A. S.; GOHDA, T.; NIEWCZAS, M. A. Progressive renal decline as the major feature of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. **Clin Exp Nephrol**. v. 18, n.4, p. 571-83. 2014.

KROLEWSKI, A. S. *et al.* Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. **Am J Cardiol**. v. 59, n.8, p. 750-5. 1987.

KRUMMEL, M. F.; ALLISON, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. **J Exp Med**. v. 182, n.2, p. 459-65. 1995.

KUEHN, H. S. *et al.* Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. **Science**. v. 345, n.6204, p. 1623-1627. 2014.

KULMALA, P. Prediabetes in children: natural history, diagnosis, and preventive strategies. **Paediatr Drugs**. v. 5, n.4, p. 211-21. 2003.

KUMAR, N. *et al.* CTLA4+49G allele associates with early onset of type 1 diabetes in North Indians. **Int J Immunogenet**. v. 42, n.6, p. 445-52. 2015.

KURIYA, G. *et al.* Double deficiency in IL-17 and IFN-gamma signalling significantly suppresses the development of diabetes in the NOD mouse. **Diabetologia**. v. 56, n.8, p. 1773-80. 2013.

KVAN, E. *et al.* High mortality in diabetic patients with acute myocardial infarction: cardiovascular co-morbidities contribute most to the high risk. **Int J Cardiol.** v. 121, n.2, p. 184-8. 2007.

LAFAGE-POCHITALOFF, M. *et al.* Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33-q34. **Immunogenetics.** v. 31, n.3, p. 198-201. 1990.

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.

LAITINEN, O. H. *et al.* Coxsackievirus B1 is associated with induction of beta-cell autoimmunity that portends type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 63, n.2, p. 446-55. 2014.

LAURIA, M. W. *et al.* The impact of functioning pancreas-kidney transplantation and pancreas alone transplantation on the lipid metabolism of statin-naive diabetic patients. **Clin Transplant.** v. 23, n.2, p. 199-205. 2009.

LEE, Y. J. *et al.* The promoter region of the CTLA4 gene is associated with type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr Endocrinol Metab.** v. 14, n.4, p. 383-8. 2001.

LEI, Y. *et al.* Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. **J Exp Med.** v. 208, n.2, p. 383-94. 2011.

LEMOS, M. C. *et al.* The CTLA4 +49 A/G polymorphism is not associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. **Int J Immunogenet.** v. 36, n.3, p. 193-5. 2009.

LI, Y. *et al.* Serum uric acid and its correlates in Chinese adult populations, urban and rural, of Beijing. The PRC-USA Collaborative Study in Cardiovascular and Cardiopulmonary Epidemiology. **Int J Epidemiol.** v. 26, n.2, p. 288-96. 1997.

LIANG, H. *et al.* Association between CTLA-4 +49 A/G polymorphism and type 1B diabetes in Japanese population. **Endocrine.** v. 25, n.2, p. 105-9. 2004.

LIBBY, P. The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. **J Am Coll Cardiol.** v. 46, n.7, p. 1225-8. 2005.

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.

LIGERS, A. *et al.* CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. **Genes Immun.** v. 2, n.3, p. 145-52. 2001.

LIGERS, A. *et al.* The CTLA-4 gene is associated with multiple sclerosis. **J Neuroimmunol.** v. 97, n.1-2, p. 182-90. 1999.

LIN, H. C. *et al.* Enterovirus infection is associated with an increased risk of childhood type 1 diabetes in Taiwan: a nationwide population-based cohort study. **Diabetologia.** v. 58, n.1, p. 79-86. 2015.

LIND, M. *et al.* Glycaemic control and incidence of heart failure in 20,985 patients with type 1 diabetes: an observational study. **Lancet.** v. 378, n.9786, p. 140-6. 2011.

LIND, M. *et al.* Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. **N Engl J Med.** v. 371, n.21, p. 1972-82. 2014.

LINDLEY, S. *et al.* Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 54, n.1, p. 92-9. 2005.

LING, V. *et al.* Assembly and annotation of human chromosome 2q33 sequence containing the CD28, CTLA4, and ICOS gene cluster: analysis by computational, comparative, and microarray approaches. **Genomics.** v. 78, n.3, p. 155-68. 2001.

LING, V. *et al.* Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. **Genomics.** v. 60, n.3, p. 341-55. 1999.

LINSLEY, P. S. *et al.* Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. **Immunity.** v. 4, n.6, p. 535-43. 1996.

LISTON, A. *et al.* Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. **Immunity.** v. 21, n.6, p. 817-30. 2004.

LISTON, A. *et al.* Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. **Nat Immunol.** v. 4, n.4, p. 350-4. 2003.

LITHOVIUS, R. *et al.* The consequences of failure to achieve targets of guidelines for prevention and treatment of diabetic complications in patients with type 1 diabetes. **Acta Diabetol.** v. 52, n.1, p. 31-8. 2015.

LIU, E. *et al.* Risk of pediatric celiac disease according to HLA haplotype and country. **N Engl J Med.** v. 371, n.1, p. 42-9. 2014.

LIU, M. F. *et al.* Increased expression of soluble cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 molecule in patients with systemic lupus erythematosus. **Scand J Immunol.** v. 57, n.6, p. 568-72. 2003.

LLOYD, C. E. *et al.* Stimulation of albumin gene transcription by insulin in primary cultures of rat hepatocytes. **Am J Physiol.** v. 252, n.2 Pt 1, p. C205-14. 1987.

LO, B. *et al.* AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. **Science**. v. 349, n.6246, p. 436-40. 2015.

LOMBARDI, A. *et al.* Dissecting the Genetic Susceptibility to Graves' Disease in a Cohort of Patients of Italian Origin. **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 7, p. 21. 2016.

LU, L.; BARBI, J.; PAN, F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. **Nat Rev Immunol**. v. 17, n.11, p. 703-717. 2017.

LUCE, S. *et al.* Single insulin-specific CD8+ T cells show characteristic gene expression profiles in human type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 60, n.12, p. 3289-99. 2011.

LUHDER, F. *et al.* Pinpointing when T cell costimulatory receptor CTLA-4 must be engaged to dampen diabetogenic T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 97, n.22, p. 12204-9. 2000.

LUTEREK-PUSZYNSKA, K. *et al.* CD28, CTLA-4 and CCL5 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol**. v. 36, n.5, p. 1129-1135. 2017.

LYTVYN, Y. *et al.* Renal and Vascular Effects of Uric Acid Lowering in Normouricemic Patients With Uncomplicated Type 1 Diabetes. **Diabetes**. v. 66, n.7, p. 1939-1949. 2017.

LYTVYN, Y. *et al.* Glycosuria-mediated urinary uric acid excretion in patients with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 308, n.2, p. F77-83. 2015.

MAAHS, D. M. *et al.* Hypertension prevalence, awareness, treatment, and control in an adult type 1 diabetes population and a comparable general population. **Diabetes Care**. v. 28, n.2, p. 301-6. 2005.

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

MACCALLUM, L. Optimal medication dosing in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease. **Can J Diabetes**. v. 38, n.5, p. 334-43. 2014.

MAEDLER, K. *et al.* Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **J Clin Invest**. v. 110, n.6, p. 851-60. 2002.

MALLONE, R.; BREZAR, V.; BOITARD, C. T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives. **Clin Dev Immunol**. v. 2011, p. 513210. 2011.

MARKLE, J. G. *et al.* Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. **Science**. v. 339, n.6123, p. 1084-8. 2013.

MARRON, M. P. *et al.* Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. **Hum Mol Genet.** v. 6, n.8, p. 1275-82. 1997.

MARTIN, A. J. *et al.* Anti-coreceptor therapy drives selective T cell egress by suppressing inflammation-dependent chemotactic cues. **JCI Insight.** v. 1, n.17, p. e87636. 2016.

MATSUNAGA-IRIE, S. *et al.* Relation between development of nephropathy and the p22phox C242T and receptor for advanced glycation end product G1704T gene polymorphisms in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care.** v. 27, n.2, p. 303-7. 2004.

MAURER, M. *et al.* A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. **Immunogenetics.** v. 54, n.1, p. 1-8. 2002.

MAYER-DAVIS, E. J.; DABELEA, D.; LAWRENCE, J. M. Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002-2012. **N Engl J Med.** v. 377, n.3, p. 301. 2017.

MCLAUGHLIN, R. J. *et al.* Human islets and dendritic cells generate post-translationally modified islet autoantigens. **Clin Exp Immunol.** v. 185, n.2, p. 133-40. 2016.

MEDICINE, D. P. G. J. D. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999. v. 23, n.8, p. 857-866. 2006.

MEDICINE, N.-S. S. I. J. N. E. J. O. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. v. 360, n.13, p. 1283-1297. 2009.

MILLER, M. *et al.* Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation.** v. 123, n.20, p. 2292-333. 2011.

MINGUENEAU, M. *et al.* Thymic negative selection is functional in NOD mice. **J Exp Med.** v. 209, n.3, p. 623-37. 2012.

MISKA, J. *et al.* Real-time immune cell interactions in target tissue during autoimmune-induced damage and graft tolerance. **J Exp Med.** v. 211, n.3, p. 441-56. 2014.

MITSUIKI, N.; SCHWAB, C.; GRIMBACHER, B. What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system? **Immunol Rev.** v. 287, n.1, p. 33-49. 2019.

MOJTAHEDI, Z. *et al.* CTLA-4 +49 A/G polymorphism is associated with predisposition to type 1 diabetes in Iranians. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 68, n.2, p. 111-6. 2005.

MOLBAK, A. G. *et al.* Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in age groups over 30 years in Denmark. **Diabet Med.** v. 11, n.7, p. 650-5. 1994.

MONTI, P. *et al.* Evidence for in vivo primed and expanded autoreactive T cells as a specific feature of patients with type 1 diabetes. **J Immunol.** v. 179, n.9, p. 5785-92. 2007.

MORAHAN, G. *et al.* Markers on distal chromosome 2q linked to insulin-dependent diabetes mellitus. **Science.** v. 272, n.5269, p. 1811-3. 1996.

MORAHAN, G. *et al.* Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. **Nat Genet.** v. 27, n.2, p. 218-21. 2001.

MOSS, S. E.; KLEIN, R.; KLEIN, B. E. Cause-specific mortality in a population-based study of diabetes. **Am J Public Health.** v. 81, n.9, p. 1158-62. 1991.

MOURA, R. R. *et al.* Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. **Am J Hum Biol.** v. 27, n.5, p. 674-80. 2015.

MUGGEO, M. *et al.* Fasting plasma glucose variability predicts 10-year survival of type 2 diabetic patients: the Verona Diabetes Study. **Diabetes Care.** v. 23, n.1, p. 45-50. 2000.

MUNN, D. H.; SHARMA, M. D.; MELLOR, A. L. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. **J Immunol.** v. 172, n.7, p. 4100-10. 2004.

NAGAMINE, K. *et al.* Positional cloning of the APECED gene. **Nat Genet.** v. 17, n.4, p. 393-8. 1997.

NAKAMURA, K.; KITANI, A.; STROBER, W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. **J Exp Med.** v. 194, n.5, p. 629-44. 2001.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>>. Acesso em: 22/01/2018.

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

NG, D. S. Diabetic dyslipidemia: from evolving pathophysiological insight to emerging therapeutic targets. **Can J Diabetes.** v. 37, n.5, p. 319-26. 2013.

NILSSON, P. M. *et al.* Smoking is associated with increased HbA1c values and microalbuminuria in patients with diabetes--data from the National Diabetes Register in Sweden. **Diabetes Metab.** v. 30, n.3, p. 261-8. 2004.

NISTICO, L. *et al.* The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. **Hum Mol Genet.** v. 5, n.7, p. 1075-80. 1996.

NITHIYANANTHAN, R. *et al.* Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. **Thyroid.** v. 12, n.1, p. 3-6. 2002.

NOBLE, J. A.; ERLICH, H. A. Genetics of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 2, n.1, p. a007732. 2012.

NOBLE, J. A.; VALDES, A. M. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. **Curr Diab Rep.** v. 11, n.6, p. 533-42. 2011.

NORHAMMAR, A. *et al.* Diabetes mellitus: the major risk factor in unstable coronary artery disease even after consideration of the extent of coronary artery disease and benefits of revascularization. **J Am Coll Cardiol.** v. 43, n.4, p. 585-91. 2004.

NWAGHA, U. I. *et al.* Atherogenic index of plasma as useful predictor of cardiovascular risk among postmenopausal women in Enugu, Nigeria. **Afr Health Sci.** v. 10, n.3, p. 248-52. 2010.

OAKS, M. K.; HALLETT, K. M. Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. **J Immunol.** v. 164, n.10, p. 5015-8. 2000.

OAKS, M. K. *et al.* A native soluble form of CTLA-4. **Cell Immunol.** v. 201, n.2, p. 144-53. 2000.

OIKARINEN, S. *et al.* Virus antibody survey in different European populations indicates risk association between coxsackievirus B1 and type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 63, n.2, p. 655-62. 2014.

OLDE NORDKAMP, M. J.; KOELEMAN, B. P.; MEYAARD, L. Do inhibitory immune receptors play a role in the etiology of autoimmune disease? **Clin Immunol.** v. 150, n.1, p. 31-42. 2014.

OLIVEIRA, L. C. *et al.* Frequency of single nucleotide polymorphisms of some immune response genes in a population sample from Sao Paulo, Brazil. **Einstein (Sao Paulo).** v. 9, n.3, p. 359-66. 2011.

OMIM. **ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN.** Disponível em: <<https://www.omim.org/>>. Acesso em: 22/01/2018.

ONENGUT-GUMUSCU, S. *et al.* Fine mapping of type 1 diabetes susceptibility loci and evidence for colocalization of causal variants with lymphoid gene enhancers. **Nat Genet.** v. 47, n.4, p. 381-6. 2015.

ONGAGNA, J. C. *et al.* Markers for risk of type 1 diabetes in relatives of Alsatian patients with type 1 diabetes. **Int J Exp Diabetes Res.** v. 3, n.1, p. 1-9. 2002.

OP DE BEECK, A.; EIZIRIK, D. L. Viral infections in type 1 diabetes mellitus--why the beta cells? **Nat Rev Endocrinol**. v. 12, n.5, p. 263-273. 2016.

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.

ORGANIZATION, W. H. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. World Health Organization, 2000.

OROZCO, G. *et al.* Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4-CT60 polymorphism in rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**. v. 64, n.6, p. 667-70. 2004.

PANG, S. *et al.* CD8(+) T cells specific for beta cells encounter their cognate antigens in the islets of NOD mice. **Eur J Immunol**. v. 39, n.10, p. 2716-24. 2009.

PARRINELLO, C. M.; SELVIN, E. Beyond HbA1c and glucose: the role of nontraditional glycemic markers in diabetes diagnosis, prognosis, and management. **Curr Diab Rep**. v. 14, n.11, p. 548. 2014.

PEAVY, D. E.; TAYLOR, J. M.; JEFFERSON, L. S. Correlation of albumin production rates and albumin mRNA levels in livers of normal, diabetic, and insulin-treated diabetic rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 75, n.12, p. 5879-83. 1978.

PEAVY, D. E.; TAYLOR, J. M.; JEFFERSON, L. S. Time course of changes in albumin synthesis and mRNA in diabetic and insulin-treated diabetic rats. **Am J Physiol**. v. 248, n.6 Pt 1, p. E656-63. 1985.

PENA, S. D. *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS One**. v. 6, n.2, p. e17063. 2011.

PHELPS, E. A. *et al.* Aberrant Accumulation of the Diabetes Autoantigen GAD65 in Golgi Membranes in Conditions of ER Stress and Autoimmunity. **Diabetes**. v. 65, n.9, p. 2686-99. 2016.

PHILIP, B.; ISABEL, W. Association of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene single nucleotide polymorphism with type 1 diabetes mellitus in Madurai population of Southern India. **Indian J Hum Genet**. v. 17, n.2, p. 85-9. 2011.

PIZARRO, M. H. *et al.* Serum uric acid and renal function in patients with type 1 diabetes: a nationwide study in Brazil. **Diabetol Metab Syndr**. v. 10, p. 22. 2018.

POCIOT, F. *et al.* Genetics of type 1 diabetes: what's next? **Diabetes**. v. 59, n.7, p. 1561-71. 2010.

POCIOT, F.; LERNMARK, A. Genetic risk factors for type 1 diabetes. **Lancet**. v. 387, n.10035, p. 2331-2339. 2016.

POCIOT, F.; MCDERMOTT, M. F. Genetics of type 1 diabetes mellitus. **Genes Immun.** v. 3, n.5, p. 235-49. 2002.

PUGLIESE, A.; MICELI, D. The insulin gene in diabetes. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 18, n.1, p. 13-25. 2002.

PUROHIT, S. *et al.* Lack of correlation between the levels of soluble cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and the CT-60 genotypes. **J Autoimmune Dis.** v. 2, p. 8. 2005.

QIN, R. *et al.* Excess risk of mortality and cardiovascular events associated with smoking among patients with diabetes: meta-analysis of observational prospective studies. **Int J Cardiol.** v. 167, n.2, p. 342-50. 2013.

QU, H. Q. *et al.* Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. **Genes Immun.** v. 10 Suppl 1, p. S27-32. 2009.

QUANDT, D. *et al.* A new role of CTLA-4 on B cells in thymus-dependent immune responses in vivo. **J Immunol.** v. 179, n.11, p. 7316-24. 2007.

QURESHI, O. S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. **Science.** v. 332, n.6029, p. 600-3. 2011.

RAMSEY, C. *et al.* Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. **Hum Mol Genet.** v. 11, n.4, p. 397-409. 2002.

RANJOURI, M. R. *et al.* Association study of IL2RA and CTLA4 Gene Variants with Type I Diabetes Mellitus in children in the northwest of Iran. **Bioimpacts.** v. 6, n.4, p. 187-193. 2016.

RASHEED, Z.; ALI, R. Reactive oxygen species damaged human serum albumin in patients with type 1 diabetes mellitus: biochemical and immunological studies. **Life Sci.** v. 79, n.24, p. 2320-8. 2006.

REDDY, M. V. *et al.* Association between type 1 diabetes and GWAS SNPs in the southeast US Caucasian population. **Genes Immun.** v. 12, n.3, p. 208-12. 2011.

RHODE, A. *et al.* Islet-specific expression of CXCL10 causes spontaneous islet infiltration and accelerates diabetes development. **J Immunol.** v. 175, n.6, p. 3516-24. 2005.

RICHARDSON, S. J. *et al.* Detection of enterovirus in the islet cells of patients with type 1 diabetes: what do we learn from immunohistochemistry? Reply to Hansson SF, Korsgren S, Ponten F *et al* [letter]. **Diabetologia.** v. 57, n.3, p. 647-9. 2014.

ROBERTSON, C. C.; RICH, S. S. Genetics of type 1 diabetes. **Curr Opin Genet Dev.** v. 50, p. 7-16. 2018.

- ROBINSON, M. T. Nutrition evidence-based guidelines for treating hyperlipidemia in children with type 1 diabetes: a case presentation. **Diabetes Educ.** v. 35, n.3, p. 408-19. 2009.
- RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. **Am J Epidemiol.** v. 169, n.4, p. 505-14. 2009.
- ROEP, B. O. The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. **Diabetologia.** v. 46, n.3, p. 305-21. 2003.
- ROEP, B. O. *et al.* A roadmap of the generation of neoantigens as targets of the immune system in type 1 diabetes. **Curr Opin Immunol.** v. 43, p. 67-73. 2016.
- ROMERO-AROCA, P. *et al.* Relationship between diabetic retinopathy, microalbuminuria and overt nephropathy, and twenty-year incidence follow-up of a sample of type 1 diabetic patients. **J Diabetes Complications.** v. 26, n.6, p. 506-12. 2012.
- ROTONDI, M. *et al.* Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. **Endocr Rev.** v. 28, n.5, p. 492-520. 2007.
- ROY, M. S.; JANAL, M. N.; ROY, A. Medical and psychological risk factors for incident hypertension in type 1 diabetic african-americans. **Int J Hypertens.** v. 2011, p. 856067. 2011.
- RUDD, C. E. The reverse stop-signal model for CTLA4 function. **Nat Rev Immunol.** v. 8, n.2, p. 153-60. 2008.
- RUI, J. *et al.* beta Cells that Resist Immunological Attack Develop during Progression of Autoimmune Diabetes in NOD Mice. **Cell Metab.** v. 25, n.3, p. 727-738. 2017.
- RUSSO, C. *et al.* Relationships between serum uric acid and lipids in healthy subjects. **Prev Med.** v. 25, n.5, p. 611-6. 1996.
- RUTLEDGE, J. C. *et al.* Role of triglyceride-rich lipoproteins in diabetic nephropathy. **Nat Rev Nephrol.** v. 6, n.6, p. 361-70. 2010.
- RYBA-STANISLAWOWSKA, M. *et al.* Elevated levels of serum IL-12 and IL-18 are associated with lower frequencies of CD4(+)CD25 (high)FOXP3 (+) regulatory t cells in young patients with type 1 diabetes. **Inflammation.** v. 37, n.5, p. 1513-20. 2014.
- SACHDEVA, A. *et al.* Lipid levels in patients hospitalized with coronary artery disease: an analysis of 136,905 hospitalizations in Get With The Guidelines. **Am Heart J.** v. 157, n.1, p. 111-117 e2. 2009.
- SANSOM, D. M. IMMUNOLOGY. Moving CTLA-4 from the trash to recycling. **Science.** v. 349, n.6246, p. 377-8. 2015.

SANSOM, D. M.; WALKER, L. S. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. **Immunol Rev.** v. 212, p. 131-48. 2006.

SARKAR, S. A. *et al.* Expression and regulation of chemokines in murine and human type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 61, n.2, p. 436-46. 2012.

SAVERINO, D. *et al.* Soluble CTLA-4 in autoimmune thyroid diseases: relationship with clinical status and possible role in the immune response dysregulation. **Clin Immunol.** v. 123, n.2, p. 190-8. 2007.

SBH. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. **Arq Bras Cardiol.** v. 95, n.1 Suppl, p. 1-51. 2010.

SCHNEIDER, A. *et al.* The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells. **J Immunol.** v. 181, n.10, p. 7350-5. 2008.

SCHNEIDER, H. *et al.* Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. **Science.** v. 313, n.5795, p. 1972-5. 2006.

SCHNEIDER, H. *et al.* Cutting edge: CTLA-4 (CD152) differentially regulates mitogen-activated protein kinases (extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase) in CD4+ T cells from receptor/ligand-deficient mice. **J Immunol.** v. 169, n.7, p. 3475-9. 2002.

SCHNEIDER, H. *et al.* CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. **Eur J Immunol.** v. 38, n.1, p. 40-7. 2008.

SCHUBERT, D. *et al.* Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. **Nat Med.** v. 20, n.12, p. 1410-1416. 2014.

SCHULTE, B. M. *et al.* Detection of enterovirus RNA in peripheral blood mononuclear cells of type 1 diabetic patients beyond the stage of acute infection. **Viral Immunol.** v. 23, n.1, p. 99-104. 2010.

SCHWAB, K. O. *et al.* Marked smoking-associated increase of cardiovascular risk in childhood type 1 diabetes. **Int J Adolesc Med Health.** v. 20, n.3, p. 285-92. 2008.

SCHWARTZ, J. C. *et al.* Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. **Nature.** v. 410, n.6828, p. 604-8. 2001.

SECRET, A. M. *et al.* Cause-specific mortality trends in a large population-based cohort with long-standing childhood-onset type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 59, n.12, p. 3216-22. 2010.

SEISSLER, J. *et al.* Immunological heterogeneity in type I diabetes: presence of distinct autoantibody patterns in patients with acute onset and slowly progressive disease. **Diabetologia**. v. 41, n.8, p. 891-7. 1998.

SEOK, H. *et al.* 1,5-anhydroglucitol as a useful marker for assessing short-term glycemic excursions in type 1 diabetes. **Diabetes Metab J**. v. 39, n.2, p. 164-70. 2015.

SHALTOUT, A. A. *et al.* Incidence of type 1 diabetes has doubled in Kuwaiti children 0-14 years over the last 20 years. **Pediatr Diabetes**. v. 18, n.8, p. 761-766. 2017.

SHARPE, A. H.; FREEMAN, G. J. The B7-CD28 superfamily. **Nat Rev Immunol**. v. 2, n.2, p. 116-26. 2002.

SHEMESH, O. *et al.* Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. **Kidney Int**. v. 28, n.5, p. 830-8. 1985.

SHIMADA, C. S. Patologia Clínica e Onco-hematologia. **Elsevier**. v. p. 2013.

SHOJAA, M. *et al.* Association between 318C/T polymorphism of the CTLA-4 gene and systemic lupus erythematosus in Iranian patients. **Int J Rheum Dis**. v. p. 2014.

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.

SILVA, T. E.; RONSONI, M. F.; SCHIAVON, L. L. Challenges in diagnosing and monitoring diabetes in patients with chronic liver diseases. **Diabetes Metab Syndr**. v. 12, n.3, p. 431-440. 2018.

SIMONE, R. *et al.* A functional soluble form of CTLA-4 is present in the serum of celiac patients and correlates with mucosal injury. **Int Immunol**. v. 21, n.9, p. 1037-45. 2009.

SIMONE, R.; SAVERINO, D. The Soluble CTLA-4 Receptor and its Emerging Role in Autoimmune Diseases. **Current Immunology Reviews**. v. 5, n.1, p. 54-68. 2009.

SINGAL, D. P.; BLAJCHMAN, M. A. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. **Diabetes**. v. 22, n.6, p. 429-32. 1973.

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.

SKOWERA, A. *et al.* beta-cell-specific CD8 T cell phenotype in type 1 diabetes reflects chronic autoantigen exposure. **Diabetes**. v. 64, n.3, p. 916-925. 2015.

SLIM, I. B. Cardiovascular risk in type 1 diabetes mellitus. **Indian J Endocrinol Metab.** v. 17, n.Suppl 1, p. S7-S13. 2013.

SMYTH, D. *et al.* Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. **Diabetes.** v. 53, n.11, p. 3020-3. 2004.

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

SONG, G. G.; LEE, Y. H. The CTLA-4 and MCP-1 polymorphisms and susceptibility to systemic sclerosis: a meta-analysis. **Immunol Invest.** v. 42, n.6, p. 481-92. 2013.

SOUZA, A. L. V. *et al.* Profile and Clinical Evolution of Patients with Type 1 Diabetes Mellitus: A Longitudinal Study at a Secondary Reference Center in Minas Gerais. **Reme Revista Mineira de Enfermagem.** v. 22, p. 2018.

SPANAKIS, E. K.; GOLDEN, S. H. Race/ethnic difference in diabetes and diabetic complications. **Curr Diab Rep.** v. 13, n.6, p. 814-23. 2013.

SPENCE, A.; TANG, Q. Restoring Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes. **Curr Diab Rep.** v. 16, n.11, p. 110. 2016.

ST-ONGE, L.; WEHR, R.; GRUSS, P. Pancreas development and diabetes. **Curr Opin Genet Dev.** v. 9, n.3, p. 295-300. 1999.

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.* Association of non-HLA genes with type 1 diabetes autoimmunity. **Diabetes.** v. 54, n.8, p. 2482-6. 2005.

STEVENS, L. A.; LEVEY, A. S. Measurement of kidney function. **Med Clin North Am.** v. 89, n.3, p. 457-73. 2005.

SZADKOWSKA, A. *et al.* Achieving target levels for vascular risk parameters in Polish school-age children with type 1 diabetes - a single center study. **J Pediatr Endocrinol Metab.** v. 31, n.10, p. 1073-1079. 2018.

TAKABA, H.; TAKAYANAGI, H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. **Trends Immunol.** v. 38, n.11, p. 805-816. 2017.

TAKAIKE, H. *et al.* Transient elevation of liver transaminase after starting insulin therapy for diabetic ketosis or ketoacidosis in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 64, n.1, p. 27-32. 2004.

TAKEZAWA, Y. *et al.* Human genetic research, race, ethnicity and the labeling of populations: recommendations based on an interdisciplinary workshop in Japan. **BMC Med Ethics.** v. 15, p. 33. 2014.

TAN, T. G.; MATHIS, D.; BENOIST, C. Singular role for T-BET+CXCR3+ regulatory T cells in protection from autoimmune diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 113, n.49, p. 14103-14108. 2016.

TANAKA, S. *et al.* Enterovirus infection, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10), and CXCR3 circuit: a mechanism of accelerated beta-cell failure in fulminant type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 58, n.10, p. 2285-91. 2009.

TANG, Q. *et al.* Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. **Immunity**. v. 28, n.5, p. 687-97. 2008.

TASKINEN, M. R. Quantitative and qualitative lipoprotein abnormalities in diabetes mellitus. **Diabetes**. v. 41 Suppl 2, p. 12-7. 1992.

TAVARES, N. A. *et al.* Association of TNF-alpha, CTLA4, and PTPN22 polymorphisms with type 1 diabetes and other autoimmune diseases in Brazil. **Genet Mol Res**. v. 14, n.4, p. 18936-44. 2015.

TEFT, W. A.; KIRCHHOF, M. G.; MADRENAS, J. A molecular perspective of CTLA-4 function. **Annu Rev Immunol**. v. 24, p. 65-97. 2006.

TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T. S. *et al.* Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c level. **Diabetes Care**. v. 23, n.12, p. 1830-4. 2000.

THOMAS, H. E. *et al.* IFN-gamma action on pancreatic beta cells causes class I MHC upregulation but not diabetes. **J Clin Invest**. v. 102, n.6, p. 1249-57. 1998.

THOMPSON, C. B.; ALLISON, J. P. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. **Immunity**. v. 7, n.4, p. 445-50. 1997.

THOMSON, G. *et al.* Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. **Am J Hum Genet**. v. 43, n.6, p. 799-816. 1988.

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.

TISCH, R.; MCDEVITT, H. Insulin-dependent diabetes mellitus. **Cell**. v. 85, n.3, p. 291-7. 1996.

TIVOL, E. A. *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. **Immunity**. v. 3, n.5, p. 541-7. 1995.

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

TODD, J. A. *et al.* Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. **Nat Genet**. v. 39, n.7, p. 857-64. 2007.

TOLONEN, N. *et al.* Different lipid variables predict incident coronary artery disease in patients with type 1 diabetes with or without diabetic nephropathy: the FinnDiane study. **Diabetes Care**. v. 37, n.8, p. 2374-82. 2014.

TONSTAD, S. Smoking cessation: how to advise the patient. **Heart**. v. 95, n.19, p. 1635-40. 2009.

TUOMI, T. *et al.* Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. **Diabetes**. v. 42, n.2, p. 359-62. 1993.

TURLEY, S. *et al.* Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. **J Exp Med**. v. 198, n.10, p. 1527-37. 2003.

TURPEINEN, H. *et al.* A linkage analysis of the CTLA4 gene region in Finnish patients with type 1 diabetes. **Eur J Immunogenet**. v. 30, n.4, p. 289-93. 2003.

UEDA, H. *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. **Nature**. v. 423, n.6939, p. 506-11. 2003.

VAARALA, O.; ATKINSON, M. A.; NEU, J. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. **Diabetes**. v. 57, n.10, p. 2555-62. 2008.

VAIDYA, B.; PEARCE, S. The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. **Eur J Endocrinol**. v. 150, n.5, p. 619-26. 2004.

VALITUTTI, S. *et al.* Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. **J Exp Med**. v. 185, n.10, p. 1859-64. 1997.

VALLANCE OWEN, J. Liver glycogen in diabetes mellitus. **J Clin Pathol**. v. 5, n.1, p. 42-53. 1952.

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 LUMMEL, M. *et al.* Posttranslational modification of HLA-DQ binding islet autoantigens in type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 63, n.1, p. 237-47. 2014.

VANDEWALLE, C. L. *et al.* Epidemiology, clinical aspects, and biology of IDDM patients under age 40 years. Comparison of data from Antwerp with complete ascertainment with data from Belgium with 40% ascertainment. The Belgian Diabetes Registry. **Diabetes Care**. v. 20, n.10, p. 1556-61. 1997.

VANDEWALLE, C. L. *et al.* Associations of GAD65- and IA-2- autoantibodies with genetic risk markers in new-onset IDDM patients and their siblings. The Belgian Diabetes Registry. **Diabetes Care**. v. 20, n.10, p. 1547-52. 1997.

VANG, T. *et al.* Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. **Nat Genet.** v. 37, n.12, p. 1317-9. 2005.

VELTHUIS, J. H. *et al.* Simultaneous detection of circulating autoreactive CD8+ T-cells specific for different islet cell-associated epitopes using combinatorial MHC multimers. **Diabetes.** v. 59, n.7, p. 1721-30. 2010.

VIGLIETTA, V. *et al.* GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. **J Clin Invest.** v. 109, n.7, p. 895-903. 2002.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol.** v. 8, n.7, p. 523-32. 2008.

VIJAYAKRISHNAN, L. *et al.* An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. **Immunity.** v. 20, n.5, p. 563-75. 2004.

VILLANO, M. J. *et al.* Autoimmune thyroiditis and diabetes: dissecting the joint genetic susceptibility in a large cohort of multiplex families. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 94, n.4, p. 1458-66. 2009.

VOULGARI, C.; KATSILAMBROS, N.; TENTOLOURIS, N. Smoking cessation predicts amelioration of microalbuminuria in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus: a 1-year prospective study. **Metabolism.** v. 60, n.10, p. 1456-64. 2011.

WADWA, R. P. *et al.* Awareness and treatment of dyslipidemia in young adults with type 1 diabetes. **Diabetes Care.** v. 28, n.5, p. 1051-6. 2005.

WALKER, L. S.; SANSOM, D. M. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. **Nat Rev Immunol.** v. 11, n.12, p. 852-63. 2011.

WALKER, L. S.; SANSOM, D. M. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. **Trends Immunol.** v. 36, n.2, p. 63-70. 2015.

WALKER, L. S.; VON HERRATH, M. CD4 T cell differentiation in type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol.** v. 183, n.1, p. 16-29. 2016.

WALLBERG, M.; COOKE, A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. **Trends Immunol.** v. 34, n.12, p. 583-91. 2013.

WALUNAS, T. L. *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. **Immunity.** v. 1, n.5, p. 405-13. 1994.

WANG, J. *et al.* Common variants on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 polymorphisms contributes to type 1 diabetes susceptibility: evidence based on 58 studies. **PLoS One.** v. 9, n.1, p. e85982. 2014.

WANG, X.-B. *et al.* Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. v. 130, n.1-2, p. 224-232. 2002.

WANG, X. B. *et al.* Expression of CTLA-4 by human monocytes. **Scand J Immunol.** v. 55, n.1, p. 53-60. 2002.

WANG, X. B. *et al.* Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. **J Neuroimmunol.** v. 130, n.1-2, p. 224-32. 2002.

WANG, X. B. *et al.* A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. **Genes Immun.** v. 3, n.4, p. 233-4. 2002.

WATERHOUSE, P. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtlA-4. **Science.** v. 270, n.5238, p. 985-8. 1995.

WELLS, A. D. *et al.* Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy. **J Clin Invest.** v. 108, n.6, p. 895-903. 2001.

WELTER, M. Avaliação de biomarcadores laboratoriais e moleculares no Diabetes mellitus Tipo 1. **UFPR.** v. p. 2018.

WELTER, M. *et al.* Reference intervals for serum 1,5-anhydroglucitol in children, adolescents, adults, and pregnant women. **Clin Chim Acta.** v. 486, p. 54-58. 2018.

WEN, L. *et al.* Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. **Nature.** v. 455, n.7216, p. 1109-13. 2008.

WHO. **Global report on diabetes.** Disponível em: Acesso em:

WILDIN, R. S.; SMYK-PEARSON, S.; FILIPOVICH, A. H. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. **J Med Genet.** v. 39, n.8, p. 537-45. 2002.

WING, K. *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. **Science.** v. 322, n.5899, p. 271-5. 2008.

WITAS, H. W.; JEDRYCHOWSKA-DANSKA, K.; ZAWICKI, P. Changes in frequency of IDDM-associated HLA DQB, CTLA4 and INS alleles. **Int J Immunogenet.** v. 37, n.3, p. 155-8. 2010.

WOJCIK, M. *et al.* Incidence of type 1 diabetes mellitus during 26 years of observation and prevalence of diabetic ketoacidosis in the later years. **Eur J Pediatr.** v. 174, n.10, p. 1319-24. 2015.

WOOD, J. P. *et al.* A recently described polymorphism in the CD28 gene on chromosome 2q33 is not associated with susceptibility to type 1 diabetes. **Eur J Immunogenet.** v. 29, n.4, p. 347-9. 2002.

XIA, Y. *et al.* Incidence and trend of type 1 diabetes and the underlying environmental determinants. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 35, n.1, p. e3075. 2019.

XUFRE, C. *et al.* Low frequency of GITR+ T cells in ex vivo and in vitro expanded Treg cells from type 1 diabetic patients. **Int Immunol.** v. 25, n.10, p. 563-74. 2013.

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

YANAGAWA, T. *et al.* CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 80, n.1, p. 41-5. 1995.

YANAGAWA, T. *et al.* Lack of association between CTLA-4 gene polymorphism and IDDM in Japanese subjects. **Autoimmunity.** v. 29, n.1, p. 53-6. 1999.

YANG, S. *et al.* Immune tolerance. Regulatory T cells generated early in life play a distinct role in maintaining self-tolerance. **Science.** v. 348, n.6234, p. 589-94. 2015.

YING, L. *et al.* The metabolism and transport of 1,5-anhydroglucitol in cells. **Acta Diabetol.** v. 55, n.3, p. 279-286. 2018.

YLIPAASTO, P. *et al.* Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. **Diabetologia.** v. 47, n.2, p. 225-39. 2004.

YOON, J. W.; JUN, H. S. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. **Am J Ther.** v. 12, n.6, p. 580-91. 2005.

YOON, J. W.; JUN, H. S.; SANTAMARIA, P. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. **Autoimmunity.** v. 27, n.2, p. 109-22. 1998.

YOSHIMATSU, G. *et al.* Pancreatic beta-Cell-Derived IP-10/CXCL10 Isletokine Mediates Early Loss of Graft Function in Islet Cell Transplantation. **Diabetes.** v. 66, n.11, p. 2857-2867. 2017.

YU, J. H. *et al.* What are our AIMS? Interdisciplinary Perspectives on the Use of Ancestry Estimation in Disease Research. **AJOB Prim Res.** v. 3, n.4, p. 87-97. 2012.

YUAN, H. *et al.* Serum Uric Acid Levels and Risk of Metabolic Syndrome: A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 100, n.11, p. 4198-207. 2015.

ZALLOUA, P. A. *et al.* Patients with early onset of type 1 diabetes have significantly higher GG genotype at position 49 of the CTLA4 gene. **Hum Immunol.** v. 65, n.7, p. 719-24. 2004.

ZHERNAKOVA, A. *et al.* CTLA4 is differentially associated with autoimmune diseases in the Dutch population. **Hum Genet.** v. 118, n.1, p. 58-66. 2005.

ZIMMET, P. Z. Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care. **Diabetologia.** v. 42, n.5, p. 499-518. 1999.

ZUCHELLI, S. *et al.* Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. **Immunity.** v. 22, n.3, p. 385-96. 2005.

ZUKLYS, S. *et al.* Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). **J Immunol.** v. 165, n.4, p. 1976-83. 2000.

ZYLKE, J. W.; DEANGELIS, C. D. Pediatric chronic diseases--stealing childhood. **JAMA.** v. 297, n.24, p. 2765-6. 2007.

SKYLER, J. S.; BAKRIS, G. L.; BONIFACIO, E.; DARSOW, T.; ECKEL, R. H.; GROOP, L.; GROOP, P. H.; HANDELSMAN, Y.; INSEL, R. A.; MATHIEU, C.; MCELVAINE, A. T.; PALMER, J. P.; PUGLIESE, A.; SCHATZ, D. A.; SOSENKO, J. M.; WILDING, J. P. H.; RATNER, R. E. Differentiation of Diabetes by **Pathophysiology, Natural History, and Prognosis.** diabetes. diabetesjournals.org doi: 10.2337/db16-0806. 2016.

SLADEK, R.; ROCHELEAU, G.; RUNG, J.; DINA, C.; SHEN, L.; SERRE, D.; FROGUEL, P.; *et al.* (2007). A genomewide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**, **445(7130)**: 881–885

SPANAKIS, E. K.; GOLDEN, S. H. Race/ethnic difference in diabetes and diabetic complications. **Curr Diab Rep.** **2013**; **13**:814-23.

SPENCE, A.; TANG, Q. Restoring Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes. **Curr Diab Rep (2016) 16**: 110 DOI 10.1007/s11892-016-0807-6.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus – Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.** Algoritmo para o tratamento do diabetes tipo 2 - atualização 2011. Posicionamento oficial SBD número 3 – 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2013-2014.** S. B. D. (2013-2014). Sao Paulo: AC Farmaceutica.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2015-2016.** S. B. D. (2015-2016). Sao Paulo: AC Farmaceutica.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes brasileiras de hipertensão. **Arq Bras Cardiol.** 2010; 95 (1 supl.1): 1-51.

SONG, G. G.; LEE, Y. H. The CTLA-4 and MCP-1 Polymorphisms and Susceptibility to Systemic Sclerosis: a Meta-analysis. **Immunological Investigations**, v. 42, n. 6, p. 481-492, 2013.

SOSKIC, B.; QURESHI, O. S.; HOU, T.; SANSOM, D. M. A transendocytosis perspective on the CD28/CTLA-4 pathway. **Adv Immunol** 124: 95–136. 2014.

ŠOUPAL, J.; ŠKRHA, J.; FAJMON, M.; HOROVÁ, E.; MRÁZ, M.; ŠKRHA, J.; PRÁZNÝ, M. (2014). A variabilidade glicêmica é maior em pacientes com diabetes tipo 1 com complicações microvasculares, independentemente do controle glicêmico. **Diabetes Technology & Therapeutics**, 16 (4), 198-203. Doi: 10.1089 / dia.2013.0205

_____ STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES--2014. **Diabetes Care**. 2014; 37(Suppl 1): S14–S80. [PubMed: 24357209]

STANKOV, K.; BENC, D.; DRASKOVIC, D. Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. **Pediatrics** 2013; 132:1112-1122

STECK, A. K.; BUGAWAN, T.L.; VALDES, A. M.; EMERY, L. M.; BLAIR, A.; NORRIS, J. M.; REDONDO, M. J.; BABU, S. R.; ERLICH, H. A.; EISENBARTH, G. S.; REWERS, J. M. Associação de Genes Não-HLA com Diabetes Tipo 1 Autoimunidade. **Diabetes Ago 2005, 54 (8) 2482-2486**; <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.8.2482>

STEVENS, L.A.; LEVEY, A.S. Medição da função renal. **Med Clin North Am**. 2005; 89: 457-73.

STRACHAN, T.; READ, A. P. Organization and expression of the human genome. In: **Strachan T, Read AP, eds. Human Molecular Genetics**. New York: BIOS Scientific Publisher Ltd., Wiley-Liss, 1996; 147-182.

SUN, T.; ZHOU, Y.; YANG, M.; HU, Z.; TAN, W.; HAN, X.; SHI, Y.; YAO, J.; GUO, Y.; YU, D.; TIAN, T.; ZHOU, X.; SHEN, H.; LIN, D. Functional genetic variations in cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 17, p. 7025-7034, 2008.

SZADKOWSKA, A.; MICHALAK, A.; CHYLIŃSKA-FRĄTCZAK, A.; *et al.* (2018) Atingir níveis-alvo para parâmetros de risco vascular em crianças de idade escolar polonesas com diabetes tipo 1 - um estudo de centro único. **Jornal de Endocrinologia Pediátrica e Metabolismo**, 31 (10), pp. 1073-1079. Retirado 29 out. 2018, do doi: 10.1515 / jpem-2018-0098

TAI, X. *et al.* Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4(+) T cells. **Blood** 119, 5155–5163. 2012.

TAKAIKE, H.; UCHIGATA, Y.; IWASAKI, N.; IWAMOTO, Y. Elevação transitória da transaminase hepática após o início da terapia com insulina para cetose diabética

ou cetoacidose no recém-diagnosticado diabetes mellitus tipo 1. **Pesquisa de Diabetes e Prática Clínica**, **64 (1)**, 27-32. doi: 10.1016 / j.diabres.2003.10.017

TAKEZAWA, Y.; KATO, K.; OOTA, H.; CAULFIELD, T.; FUJIMOTO, A.; HONDA, S.; *et al.* Human genetic research, race, ethnicity and the labeling of populations: recommendations based on an interdisciplinary workshop in Japan. **BMC Med Ethics**. **2014**; **15**:33.

TAN *et al.* Spectrum of immune checkpoint inhibitors-induced endocrinopathies in cancer patients: a scoping review of case reports. **Clinical Diabetes and Endocrinology (2019)** 5:1.< <https://doi.org/10.1186/s40842-018-0073-4>>

TAVARES, N. A.; SANTOS, M. M.; MOURA, R. *et al.* Association of TNF-alpha, CTLA-4, and PTPN22 polymorphisms with type 1 diabetes and other autoimmune diseases in Brazil. **Genet Mol Res****14**: 18936–18944. 2015.

TASKINEN, M. R. Anormalidades quantitativas e qualitativas de lipoproteínas no *diabetes mellitus*. **Diabetes** **1992**; 41 (Supl. 2): 12 - 17 pmid: 1526330

TEFT, W. A.; KIRCHHOF, M. G.; MADRENAS, J. A molecular perspective of CTLA-4 function. **Annu Rev Immunol** **2006**; **24**: 65-97.

TEUTSCH, S. M.; BOOTH, D. R.; BENNETTS, B. H.; *et al.* Association of common T cell activation gene polymorphisms with multiple sclerosis in Australian patients. **Journal of Neuroimmunology** **148**:218–230. Australia, 2004.

_____ THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP (DCCT). Influence of intensive diabetes treatment on body weight and composition of adults with type 1 diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes Care**. **2001**;**24(10)**:1711-21.

_____ THE DIAMOND PROJECT GROUP. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999. Journal compilation UK. Diabetic Medicine, v. 23, n. 16, p. 857–866, Feb. 2006.

_____ THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. **Nature**, **v.449**, p. 851-861, 2007.

_____ THE NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE – NICE guideline. Type 1 diabetes in adults: diagnosis and management. **NICE**, **p. 1-87**, 2015.

THIO, C. L.; MOSBRUGER, T. L.; KASLOW, R. A.; KARP, C. L.; STRATHDEE, S. A.; VLAHOF, D.; O'BRIEN, S. J.; ASTEMBORSKI, J.; THOMAS, D. L. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and recovery from hepatitis B virus infection. **Journal of Virology**, **78(20)**:11258-11262, 2004.

THOMPSON, C. B.; ALLISON, J. P. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. **Immunity** **1997**; **7**: 445-50.

THOMSON, G.; ROBINSON, W. P.; KUHNER, M. K.; JOE, S.; MACDONALD, M. J.; GOTTSCHALL, J. L.; BARBOSA, J.; RICH, S. S.; BERTRAMS, J.; BAUR, M. P. 1988. Genetic heterogeneity, modes of inheritance, and risk estimates for a joint study of Caucasians with insulin-dependent diabetes mellitus. **Am J Hum Genet** **43**:799–816

TIVOL, E.A.; BORRIELLO, F.; SCHWEITZER, A. N.; LYNCH, W. P.; BLUESTONE, J. A.; SHARPE, A. H. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. **Immunity** **1995**; 3:541-7.

TOLONEN, N.; *et al.* Different Lipid Variables Predict Incident Coronary Artery Disease in Patients with Type 1 Diabetes with or Without Diabetic Nephropathy: The Finn Diane Study. **Diabetes Care** **2014**; 37:2374–2382 | DOI: 10.2337/dc13-2873

TONSTAD, S. Cigarette smoking, smoking cessation, and diabetes. **Diabetes Res Clin Pract** **2009**; 85:4–13.

TRUITT, K. E.; HICKS, C. M.; IMBODEN, J. B. Stimulation of CD28 triggers an association between CD28 and phosphatidylinositol 3-kinase in Jurkat T cells. **J Exp Med** **1994**; **179**:1071–1076.

TUOMILEHTO, J. The Emerging Global Epidemic of Type 1 Diabetes. Diabetes epidemiology (sh golden, section editor). **Curr Diab Rep (2013)** **13**:795 – 804
DOI 10.1007/s11892-013-0433-5.

TURNER, R.C.; MILLNS, H.; NEIL, H.A.; *et al.* Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom prospective diabetes study. (UKPDS: 23). **BMJ.** **1998**; 316:823–8.

TURPEINEN, H.; LAINE, A. P.; HERMANN, R.; SIMELL, O.; VEIJOLA, R.; KNIP, M.; ILONEN, J. A linkage analysis of the CTLA-4 gene region in Finnish patients with type 1 diabetes. **Eur. J. Immunogenet.** **30**: 289–293. 2003.

UEDA, H.; HOWSON, J. M.; ESPOSITO, L.; HEWARD, J.; SNOOK, H.; CHAMBERLAIN, G.; RAINBOW, D. B.; HUNTER, K. M.; SMITH, A. N.; DI GENOVA, G.; HERR, M. H.; DAHLMAN, I.; PAYNE, F.; SMYTH, D.; LOWE, C.; TWELLS, R. C.; HOWLETT, S.; HEALY, B.; NUTLAND, S.; RANCE, H. E.; EVERETT, V.; SMINK, L. J.; LAM, A. C.; CORDELL, H. J.; WALKER, N. M.; BORDIN, C.; HULME, J.; MOTZO, C.; CUCCA, F.; HESS, J. F.; METZKER, M. L.; ROGERS, J.; GREGORY, S.; ALLAHABADIA, A.; NITHIYANANTHAN, R.; TUOMILEHTO-WOLF, E.; TUOMILEHTO, J.; BINGLEY, P.; GILLESPIE, K. M.; UNDLIEN, D. E.; RØNNINGEN, K. S.; GUJA, C.; IONESCU-TÎRGOVIȘTE, C.; SAVAGE, D. A.; MAXWELL, A. P.; CARSON, D. J.; PATTERSON, C. C.; FRANKLYN, J. A.; CLAYTON, D. G.; PETERSON, L. B.; WICKER, L. S.; TODD, J. A.; GOUGH, S. C. Association of the T-cell regulatory gene CTLA-4 with susceptibility to autoimmune disease. **Nature**, **v.423**, n. 6939, p. 505-511, 2003.

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.

UZER, E.; DILMEC, F.; AKKAFI, F.; BODUROGLU, O.; VAN KUILENBURG, A. B. P. Investigation of CTLA-4 and CD28 Gene Polymorphisms in Patients with Diabetes Mellitus Type 2 Using PCR-RFLP in a Turkish Population. **West Indian Med J** 2010; 59 (3): 235

VALK, E.; RUDD, C.; SCHNEIDER, H. 2008. CTLA-4 tráfico e expressão de superfície. **Trends in Immunology**, 29, 272-279. doi: 10.1016 / j.it.2008.02.011

VALLANCE-OWEN, J. Liver glycogen in diabetes mellitus, **J. Clin.Pathol.** 5 (1952) 42–53.

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 OOSTERHOUT, A.J.M.; DEURLOO, D. T.; GROOT, P. C. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 polymorphisms and allergic asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, 34: 4-8, 2004.

VAN VEEN, T.; CRUSIUS, J. B.; VAN WINSEN, L.; XIA, B.; BARKHOF, F.; SALVADOR PENA, A.; POLMAN, C. H.; UITDEHAAG, B. M. CTLA-4 and CD28 gene polymorphisms in susceptibility, clinical course and progression of multiple sclerosis. **J Neuroimmunol** 140:188, 2003.

VILLANO, M.J.; HUBER, A.K.; GREENBERG, D.A.; GOLDEN, B.K.; CONCEPCION E.; *et al.* (2009). Autoimmune thyroiditis and diabetes: dissecting the joint genetic susceptibility in a large cohort of multiplex families. **J Clin Endocrinol Metab** 94:1458–66.

VOULGARI, C.; KATSILAMBROS, N.; TENTOLOURIS, N. Smoking cessation predicts amelioration of microalbuminuria in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus: a 1-year prospective study. **Metabolism** 2011; 60:1456–64.

WADWA, R.P.; KINNEY, G.L.; MAAHS, D.M.; *et al.* Awareness and treatment of dyslipidemia in Young adults with type 1 diabetes. **Diabetes Care**. 2005; 28(5):1051–1056. [PubMed: 15855566]

WALKER, L. S.; SANSOM, D. M. The emerging role of CTLA-4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. **Nat Rev Immunol** 11:852–863. 2011.

WALKER, L. S. K.; SANSOM, D. M. Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 Biology. **Trends in Immunology**, February 2015, Vol. 36, No. 2 <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.12.001>.

WALLBERG, M.; COOKE, A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. **Trends Immunol**. v. 34, n.12, p. 583-91. 2013.

WANG, X. B.; KAKOULIDOU, M.; GISCOMBE, R.; QIU, Q.; HUANG, D. R.; PIRSKANEN, R.; LEFVERT, A. K. Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect on AT- rich gene sequence. **Journal of Neuroimmunology**, **130**: 224 – 232. 2002.

WANG, J.; LIU, L.; MA, J.; SUN, F.; ZHAO, Z.; *et al.* (2014) Common Variants on Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 Polymorphisms Contributes to Type 1 Diabetes Susceptibility: Evidence Based on 58 Studies. **PLoS ONE** **9(1)**: e85982. doi: 10.1371/journal.pone.0085982

WATERHOUSE, P.; PENNINGER, J. M.; TIMMS, E. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. **Science** **270**:985–988. 1995a.

WATERHOUSE, P.; PENNINGER, J. M.; TIMMS, E. *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. **Science** **270**:985–988. 1995b.

WELLS, A. D.; WALSH, M. C.; BLUESTONE, J. A.; TURKA, L. A. Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy. **J. Clin. Invest.** **108**:895–903. 2001.

WELTER, M. *et al.* Polymorphism rs2476601 in the PTPN22 gene is associated with type 1 diabetes in children from the South Region of Brazil. **Gene**. v. **650**, p. 15-18. 2018.

WITAS, H. W.; DANSKA, K. J.; ZAWICKI, P. Changes in frequency of IDDM-associated HLA DQB, CTLA-4 and INS alleles. **International Journal of Immunogenetics** **37**, 155–158. doi: 10.1111/j.1744-313X.2010. 00896.x

WOOD, J.P.; PANI, M.A.; BIEDA, K.; MEYER, G.; USADEL, K.H.; BADENHOOP, K., 2002. A recently described polymorphism in the CD28 gene on chromosome 2q33 is not associated with susceptibility to type 1 diabetes. **Eur. J. Immunogenet.** **29**, 347–349.

_____WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO 2000**: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva, 2000.

_____WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO 2003**: screening for type 2 diabetes. Report of a World Health Organization and International Diabetes Federation Meeting. Geneva, 2003.

XAVIER, H. T. *et al.* [V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis]. **Arq Bras Cardiol.** v. 101, n.4 Supl 1, p. 1-20. 2013.

XIONG, Y. H.; HE, L.; FEI, J. Genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 and susceptibility to cervical cancer. **International Immunopharmacology**, v. **18**, n. 1, p. 71-76, 2013.

YAKARYILMAZ, F. D.; ÖZTÜRK, Z. A. Treatment of type 2 diabetes mellitus in the elderly. **World J Diabetes** 2017 June 15; 8(6): 278-285. ISSN 1948-9358. DOI: 10.4239/wjd.v8.i6.278. <http://www.f6publishing.com>

YAMANOUCHI, T.; AKANUMA, Y. Serum 1,5-anhydroglucitol (1,5 AG): new clinical marker for glycemic control, **Diabetes Res. Clin. Pract.** 24 (Suppl) (1994) S261–S268.

YANAGAWA, T.; HIDAKA, Y.; GUIMARAES, V.; SOLIMAN, M.; DEGROOT, L. J. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, n. 1, p. 41-45, 1995.

YING, L.; MA, X.; YIN, J.; WANG, Y.; ELE, X.; PENG, J.; JIA, W. (2018). O metabolismo e transporte de 1,5-anidroglucitol nas células. **Acta Diabetologica**, 55 (3), 279-286. doi: 10.1007 / s00592-017-1093-8

YOKOTA, N.; MIYAKOSHI, T.; SATO, Y.; NAKASONE, Y.; YAMASHITA, K.; IMAI, T.; HIRABAYASHI, K.; KOIKE, H.; YAMAUCHI, K.; AIZAWA, T. Predictive models for conversion of prediabetes to diabetes. **Journal of Diabetes and Its Complications** (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.01.005>.

YU, J. H.; TAYLOR, J. S.; EDWARDS, K. L.; FULLERTON, S. M. What are our AIMS? Interdisciplinary Perspectives on the Use of Ancestry Estimation in Disease Research. **AJOB Prim Res.** 2012; 3:87-97.

YUAN, H.; YU, C.; LI, X.; SUN, L.; ZHU, X.; ZHAO, C.; ZHANG, Z.; YANG, Z. Serum Uric Acid Levels and Risk of Metabolic Syndrome: A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 2015, 100, 4198–4207.

ZHANG, X.; DECKER, F. H.; LUO, H.; GEISS, L. S.; PEARSON, W. S.; SAADDINE, J. B.; GREGG, E. W.; ALBRIGHT, A. Trends in the prevalence and comorbidities of diabetes mellitus in nursing home residents in the United States: 1995-2004. **J Am Geriatr Soc** 2010; 58: 724-730 [PMID: 20398154 DOI: 10.1111/j.15325415.2010.02786.x].

ZHANG, Y.; HU, G.; YUAN, Z.; CHEN, L. Glycosylated hemoglobin in relationship to cardiovascular outcomes and death in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**; 7: e42551 [PMID: 22912709 doi: 10.1371/journal.pone.0042551]; 2012.

ZHOU, Q.; SHI, D.B.; LV, L.Y. (2016). O estabelecimento de intervalos de referência biológicos de marcadores glicêmicos não tradicionais em uma população chinesa. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, 31 (5), e22097. doi: 10.1002 / jcla.22097

ZHU, Y.; ZHANG, C. Prevalence of Gestational Diabetes and Risk of Progression to Type 2 Diabetes: A Global Perspective. *Diabetes and Pregnancy* (Cj Homko, Section Editor). **Curr Diab Rep 16**: 7 DOI 10.1007/s11892-015-0699-x. 2016.

ANEXO 1

TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde SCS - UFPR

PROJETO DE PESQUISA

Título: Isoformas solúveis do receptor de produtos de glicação avançada (sRAGE) no Diabetes mellitus tipos 1, 2 e gestacional.

Pesquisador: Mauren Isfer Anghebem Oliveira

Versão: 1

Instituição: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde SCS

CAAE: 01038112.0.0000.0102

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 7186

Data da Relatoria: 28/03/2012

Apresentação do Projeto: É um estudo caso-controle para análise de determinadas proteínas (sRAGE) com retirada de sangue em sujeitos portadores de diabetes mellitus tipo I (n=100), tipo 11 (n= 100) e gestacional (n=100), recrutados na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas (HC) da UFPRSEMPR, além de um grupo controle (n=300) composto de voluntários recrutados também no Hospital de Clínicas da UFPR. Para análises de dados da história clínica, biométricos dos sujeitos, os pesquisadores terão acesso ao prontuário dos sujeitos. As sRAGE encontram-se ligadas a complicações vasculares da diabetes, tendo, portanto, grande importância na compreensão da fisiopatologia da diabetes e de seu tratamento.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo principal da pesquisa é identificar novos biomarcadores de risco/proteção associados à presença e concentração das isoformas solúveis do receptor para produtos finais de glicação avançada (sRAGE) em portadores de diabetes mellitus tipo I, " ou gestacional. Há o objetivo também de criar um biorepositório.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: O projeto detalha de forma clara os riscos e os benefícios da pesquisa. Os riscos consistem nos riscos de um exame de sangue padrão (dor, incômodo, hematoma). Este exame já é feito de rotina nos pacientes portadores de Diabetes do HC, a amostra podendo ser utilizada para a pesquisa mediante o TCLE. Os benefícios são descritos claramente no projeto, assim como nos seus dois TCLE (para portadores de diabetes e controles).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa faz parte de um projeto de Doutorado em Farmácia e Bioquímica. Ela apresenta metodologia sólida, conforme descrito na análise de mérito criteriosa. Ela faz parte da formação de um biorepositório, nos TCLE está explicitado que as amostras poderão ser utilizadas em pesquisas posteriores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Todos os documentos necessários foram apresentados. Os TCLE precisam ser modificados para se adequar a legislação sobre biorepositórios.

Recomendações: O item g dos TCLE tem de ser modificado. Como se trata de uma pesquisa que cria um biorepositório e não biobanco, todas as novas pesquisas necessitarão de TCLE. O TCLE deve ser modificado para se adequar às considerações descritas acima.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Explicar que se trata da criação de um biorepositório nos objetivos. O Projeto de pesquisa pode ser aprovado, se este se adequar a legislação sobre biorepositórios, com modificações no TCLE. Citar os riscos no TCLE da armazenagem do material biológico.

No TCLE deve-se descrever caso alguma descoberta seja feita referente à pesquisa, os sujeitos têm o direito de saber ou se recusar a saber o resultado da pesquisa.

Cada nova pesquisa necessitará de novo TCLE.

Deve-se descrever no TCLE por quanto tempo a amostra será guardada e como será descartada (Ex: riscos ao meio ambiente?).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Não há considerações.

Instituição Coparticipante: Hospital de Clinicas da UFPR.

CURITIBA, 16 de abril de 2012.

Assinado por: Claudia Seely Rocco

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nós, Mauren Isfer Anghebem Oliveira e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, paciente com diabetes atendido no Serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado "Isoformas solúveis do receptor de produtos de glicação avançada (sRAGE) no Diabetes mellitus tipos 1, 2 e gestacional", que vai pesquisar a presença de formas solúveis desse receptor no seu sangue. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

- a) O objetivo desta pesquisa é procurar novos exames para melhor controlar e monitorar o paciente com diabetes e ainda conhecer os fatores que levam o paciente diabético a ter maior ou menor risco para complicações vasculares, como o pé diabético, a cegueira e o infarto do coração.
- b) Caso você participe da pesquisa, seus dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) e dados sobre resultados de exames (exames de sangue, histórico clínico) serão repassados para os pesquisadores pelo seu médico. Além disso, será necessário coletar uma amostra de seu sangue.
- c) O sangue será coletado durante o procedimento de coleta de rotina do serviço da Unidade de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR), após sua consulta médica, sem necessidade de coleta específica para a pesquisa.
- d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.
- e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que desaparecerão com o tempo.
- f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento de doenças que atingem muitos indivíduos como o Diabetes mellitus tipos 1, 2 e gestacional, 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e acompanhamento sobre o diabetes, 3) novas associações entre a presença das formas do receptor que pretendemos estudar e as complicações do diabetes. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- g) Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças como o diabetes e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.
- h) Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos à saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável _____
Orientador _____ Orientado _____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

-) Os pesquisadores responsáveis por este estudo: Mauren Isfer Anghebem Oliveira (mauren.isfer@ufpr.br) e Geraldo Picheth (gpicheth@ufpr.br), farmacêuticos, poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para

esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

- j) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento no serviço de Endocrinologia Diabética, que está assegurado.
- l) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como seu médico. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- m) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados no próprio serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR).
- n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.
- o) Caso alguma descoberta seja feita referente à pesquisa, você terá o direito de saber ou se recusar a saber o resultado.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item "e". Em relação ao item "o", eu _____ (desejo/ não desejo) saber os resultados/descobertas feitas referentes à pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu sangue para futuras pesquisas, sabendo que a cada nova pesquisa, serei contatado para consentir ou não o novo uso de minha amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Assinatura do Pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 3

PLANILHA DE COLETA DE DADOS

Questionário utilizado para coleta de dados dos pacientes com DM1, adultos diagnosticados após 18 anos.

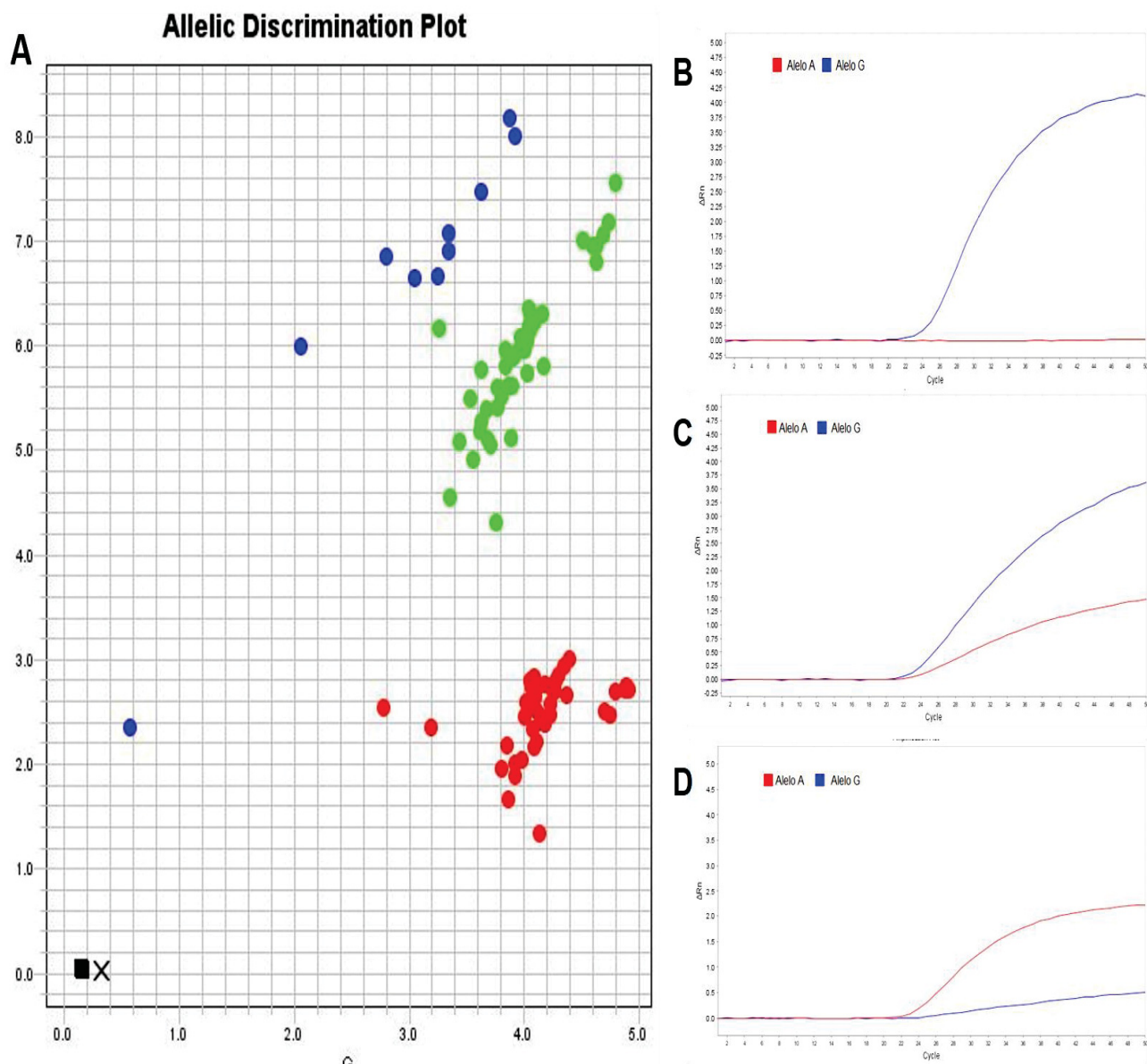
Planilha de coleta de dados:

Caracterização do Paciente		Data
Registro HC:		/ /
Nome:		
Dados clínicos		
N	Dados	Obs.
1	Idade	[.] anos
2	Peso	[] kg
3	Altura	[] cm
4	Etnia	(1)= Euro brasileiro (2)= Afro brasileiro (3)= Índio (4)= Oriental
5	Tipo de Diabetes	(1)= Tipo 1 (2)= Tipo 2 Tempo do início do DM; anos
6	Pressão Arterial (PA)	[/] mmHg Medicamentos para pressão:
7	Tabagismo	(1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = Fumante
8	Histórico Obesidade	(1)= Sim (2)= Não pessoal
9	História familiar de diabetes	Pais: (1) = Sim (2) = Não Avós: (1) = Sim (2) = Não Demais familiares: (1)=Sim (2)= Não Quais:
10	História familiar de DAC	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não
11	História familiar de Doença Tireoideana	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não
12	Medicamentos:	Descrever: <u>Hipolipemiante</u> <u>Tireóide</u> <u>Hipoglicemiante:</u> Insulina:
13	Exames:	Glicemia de jejum: TOTG: Perfil: Pós-prandial: Hb glicada: Creatinina Microalbuminúria: TSH: aTG aTPO Outros:
14	Outras patologias:	Doenças Autoimunes: (1)= Sim (2)= Não
15	Outras observações	

ANEXO 4

GRÁFICO DE DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA

Exemplo de PCR em tempo real - Taqman® - para o polimorfismo de nucleotídeo único rs231775 (+49AG) do gene *CTLA-4*.



A) Discriminação alélica. Em vermelho estão as amostras homocigotas dominantes (genótipo AA); em verde, amostras heterocigotas (genótipo AG), e em azul as amostras homocigotas de menor frequência (genótipo GG). Em preto, controle negativo.

B) Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo GG (sonda azul).

C) Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo AG (sonda azul e vermelha).

D) Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo AA (sonda vermelha).